

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von 5-HT_{1A} Rezeptoren auf die embryonale und postnatale
Entwicklung des serotonergen Systems im Gehirn der Maus

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Von

Frau Dongrui Deng

aus Wuhan, China

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Hörtnagl
 2. PD. Dr. med. M. Bader
 3. PD. Dr. med. G. Grosse

Datum der Einreichung: 02.05.2003

Datum der Promotion: 23.09.2003

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Entwicklung und Rolle des serotonergen Systems im Gehirn	7
1.1.1	Aufbau und Transmissionsmechanismus des serotonergen Systems im Gehirn	7
1.1.2	Verteilung des serotonergen Systems im Gehirn	8
1.1.3	Wachstum und Entwicklung des serotonergen Systems im Gehirn.....	9
1.1.4	Rolle von 5-HT während der Entwicklung des serotonergen Systems und dessen Projektionsgebiete	11
1.1.5	Funktionen des serotonergen Systems im Gehirn	12
1.1.6	Einfluss von S-100 β auf das serotonerge System	12
1.2	5-HT Rezeptoren	14
1.2.1	Eigenschaften des 5-HT _{1A} Rezeptors	14
1.2.2	Verteilung des 5-HT _{1A} Rezeptors im Gehirn	15
1.2.3	Funktionen des 5-HT _{1A} Rezeptors im Gehirn	15
1.3	5-HT _{1A} Rezeptor Knockout (KO) Maus	16
1.4	Pharmakologische Aktivierung des 5-HT _{1A} Rezeptors	18
1.5	Überexpression des 5-HT _{1A} Rezeptors in der Maus	18
1.6	Catecholaminerge Systeme im Gehirn	19
1.6.1	Aufbau und Funktion der catecholaminergen Systeme.....	19
1.6.2	Verteilung der catecholaminergen Systeme	20
1.6.3	Entwicklung der catecholaminergen Systeme.....	22
1.7	Interaktionen zwischen den monoaminergen Systemen	23
1.8	Einfluss serotonerger Neurone auf die embryonale Entwicklung anderer Neurotransmittersysteme	24
2	FRAGESTELLUNG	25
3	MATERIAL UND METHODEN	26
3.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	26
3.2	Chemikalien und Reagenzien	26
3.3	Verwendete Antikörper	30
3.3.1	Primärantikörper.....	30
3.3.2	Sekundärantikörper	30

3.4	Geräte und Materialien	31
3.5	Methoden	32
3.5.1	Genotypisierung mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	32
3.5.1.1	Lösungen und Puffer	32
3.5.1.2	DNA Extraction aus dem Mausschwanz.....	32
3.5.1.3	Primer	33
3.5.1.4	Vorbereitung für PCR-Ansätze	33
3.5.1.5	Durchführung der PCR.....	34
3.5.1.6	Agarose-Gelelektrophorese	34
3.5.2	Autoradiographie.....	34
3.5.2.1	Lösungen und Puffer	34
3.5.2.2	Durchführung der Autoradiographie	35
3.5.3	Immunhistochemie	35
3.5.3.1	Verwendete Lösungen und Puffer	35
3.5.3.2	Präparation der Gehirne.....	36
3.5.3.2.1	Gehirne von embryonalen und P1,5 Mäusen	36
3.5.3.2.2	Gehirne von P15,5 Mäusen	37
3.5.3.3	DAB – Immunfärbung.....	37
3.5.4	Western Blot.....	39
3.5.4.1	Verwendete Lösungen und Puffer	39
3.5.4.2	Aufarbeitung der Gehirne.....	40
3.5.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
3.5.4.4	Western Blot und Immundetektion	41
3.5.4.4.1	SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS – PAGE)	41
3.5.4.4.1.1	Herstellung des Gels	41
3.5.4.4.1.2	Aufragung der Proben und Standards	41
3.5.4.4.1.3	Gelelektrophorese	42
3.5.4.4.2	Western Blot	42
3.5.4.4.3	Immundetektion	43
3.5.5	Quantitative Analyse von Monoamin-Neurotransmittern und deren Metaboliten mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion (HPLC-ED).....	44
3.5.5.1	Durchführung der HPLC-ED.....	44

3.5.5.1.1	Die Bedingungen der Bestimmung von 5-HT und 5-HIAA	44
3.5.5.1.2	Die Bedingungen der Bestimmung von DA und NA	45
3.5.5.2	Präparation und Aufarbeitung der Gehirne	45
3.5.5.2.1	Bestimmung von 5-HT und 5-HIAA	46
3.5.5.2.2	Bestimmung von DA und NA	46
3.5.6	Statistische Auswertung	46
4	ERGEBNISSE	47
4.1	Genotypisierung der KO, WT und ÜE Mäuse	47
4.2	Vergleich der Hirnentwicklung während der embryonalen und frühpostnatalen Periode anhand der Gewichtszunahme bei KO, WT und ÜE Mäusen	47
4.3	Autoradiographischer Nachweis von 5-HT _{1A} Rezeptor	48
4.4	Immunhistochemische Analyse bei KO, WT und ÜE Mäusen	50
4.4.1	Vergleich der Entwicklung der serotonergen Raphe Neurone in den drei MäuseLinien	50
4.4.2	Quantifizierung der serotonergen Neurone in der dorsalen Raphe bei P15,5 Mäusen	52
4.4.3	Vergleich der Entwicklung der serotonergen Fasern in den Projektionsregionen bei den verschiedenen Mäuse-Linien	53
4.4.3.1	Verteilung und Dichte der serotonergen Fasern zum Zeitpunkt E12,5	53
4.4.3.2	Entwicklung und Verteilung der serotonergen Fasern im cerebralen Cortex	53
4.4.3.3	Entwicklung und Verteilung der serotonergen Fasern im Hippocampus	55
4.4.3.4	Entwicklung und Verteilung der serotonergen Fasern im Septum	56
4.4.3.5	Entwicklung und Verteilung der serotonergen Fasern im Striatum	58
4.4.4	Immunreaktivität der TPH im dorsalen Raphe Nucleus	58
4.4.5	Vergleich der catecholaminergen Neurone in den drei Mäuse-Linien	59
4.4.5.1	Entwicklung der dopaminergen Neurone im Bulbus olfactorius	59
4.4.5.2	Entwicklung der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra compacta und dem ventralen Tegmentum der drei Mäuse-Linien	60
4.4.5.3	Entwicklung der noradrenergen Neurone in den drei Mäuse-Linien	60
4.4.6	Vergleich des S100 β Proteins im Gehirn der verschiedenen Mäuse-Linien zum Zeitpunkt P15,5	64
4.4.7	Vergleich von MBP im Gehirn der drei Mäuse-Linien zum Zeitpunkt P15,5	64

4.5	Proteinexpression bei verschiedenen Entwicklungsstadien im Gehirn der drei MäuseLinien	67
4.5.1	Western Blot-Analyse des TH Proteins.....	67
4.5.2	Western Blot-Analyse verschiedener synaptischer, vesikel-relevanter Proteine	67
4.5.3	Western Blot-Analyse von MBP	69
4.6	Quantitative Bestimmung der Monoamin-Transmitter und deren Metabolite im Gehirn der KO, WT und ÜE Mäuse mittels HPLC-ED	69
4.6.1	Unterschiedliche Gewebskonzentrationen von 5-HT und 5-HIAA im Gehirn während der verschiedenen Entwicklungsstadien.....	69
4.6.2	Unterschiedliche Gewebskonzentrationen von DA und NA im Gehirn während der Entwicklungsstadien.....	71
4.6.3	Bestimmung der Gewebskonzentrationen von 5-HT und 5-HIAA in verschiedenen Hirnregionen bei den drei Mäuse-Linien zum Zeitpunkt P15,5.....	71
4.6.4	Bestimmung der Konzentrationen von DA, DOPAC und NA in verschiedenen Hirnregionen bei den drei Mäuse-Linien zum Zeitpunkt P15,5.....	73
5	DISKUSSION	75
5.1	Unterschiedliche Expression des 5-HT _{1A} Rezeptors bei den drei Mäuse-Linien	75
5.2	Entwicklung des serotonergen Systems im Gehirn bei den drei Mäuse-Linien	75
5.2.1	Generelle Entwicklung des Gehirns	75
5.2.2	Embryonale und frühpostnatale Entwicklung des serotonergen Systems.....	76
5.3	Entwicklung der catecholaminergen Systeme bei den drei Mäuse-Linien	79
5.4	Korrelation zwischen dem serotonergen System und S100 β	83
5.5	Einfluss des 5-HT _{1A} Rezeptors auf die Synaptogenese und Myelinisierung	84
6	ZUSAMMENFASSUNG	86
7	LITERATURVERZEICHNIS	88
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	102
9	DANKSAGUNG	106
10	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	107

1 EINLEITUNG

1.1 Entwicklung und Rolle des serotonergen Systems im Gehirn

1.1.1 Aufbau und Transmissionsmechanismus des serotonergen Systems im Gehirn

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) wurde zuerst in der Peripherie als vasokonstriktorischer Faktor gefunden, woher sich der Name ableitet. 5-HT ist ein Monoamin-Neurotransmitter, der im Zentralnervensystem (ZNS), in peripheren Nervensystemen und enterochromaffinen Zellen des Magendarmtrakts und in Thrombocyten gefunden wird. Im ZNS dient 5-HT nicht nur als ein bedeutsamer Neurotransmitter, sondern auch als ein Neuromodulator.

Tryptophan ist der Ausgangsstoff für die Synthese von 5-HT und wird durch die cytoplasmatische Tryptophanhydroxylase (TPH) zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert und anschließend durch L-aromatische Aminosäuredecarboxylase zu 5-HT decarboxyliert (Abb.1). Der vesikuläre Monoamin-Transporter-2 transportiert 5-HT in die präsynaptischen Vesikel. Das vesikulär gespeicherte 5-HT wird durch Aktionspotentiale exocytotisch freigesetzt und dann größtenteils aus dem synaptischen Spalt durch einen spezifischen Serotonintransporter wieder in die serotonergen Nervendigungen aufgenommen. Das wiederaufgenommene 5-HT unterliegt entweder der Wiederaufnahme (Re-uptake) in die Speichervesikel oder einer oxidativen Desaminierung durch die mitochondriale Monoaminoxidase (MAO) A. Das entstehende Aldehyd wird überwiegend durch Aldehyddehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) umgewandelt. 5-HIAA ist der Hauptmetabolit von 5-HT. Nach Wiederaufnahme in die Vesikel steht 5-HT wieder als Neurotransmitter zur Verfügung. Sobald 5-HT über Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt wird, bindet es an die postsynaptischen Rezeptoren, dadurch wird das Signal von einer Zelle auf die nächste Zelle übertragen. 5-HT bindet auch an präsynaptische 5-HT_{1B/D} Autorezeptoren, welche die Freisetzung von 5-HT regulieren. Somatodendritische präsynaptische 5-HT_{1A} Rezeptoren in der Raphe sind an der Regulierung der Aktivität serotonerger Neurone beteiligt. In der embryonalen Entwicklung des ZNS kann 5-HT als ein neurotropher Faktor für serotonerge Neurone wirken, aber auch die Entwicklung nicht-serotonerger Neurone in den serotonergen Zielgebieten vorantreiben. (Veenstra-Vander Weele et al., 2000; Povlock und Amara, 1997).

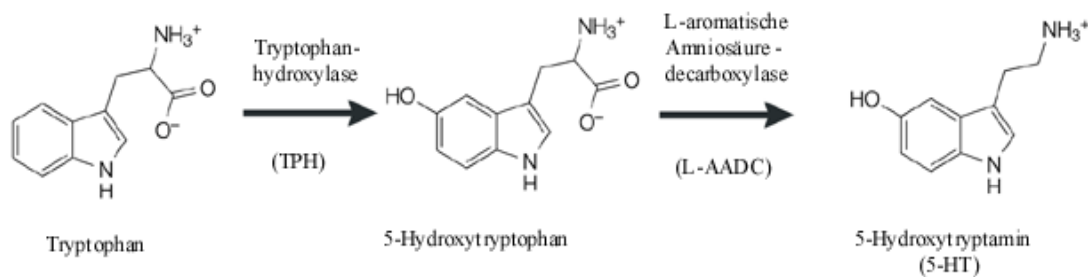


Abb. 1 Synthese von 5-HT

1.1.2 Verteilung des serotonergen Systems im Gehirn

Das serotonerge System ist eines der am umfangreichsten ausbreiteten Nervensysteme im ZNS. Die meisten Zellkörper der serotonergen Neurone befinden sich in verschiedenen Kernen der Raphe (Abb. 2). Zellkörper sind aber auch in der medianen und paramedianen Formatio reticularis des Mesencephalons, dem Tegmentum mesencephalon, dem Pons cerebri sowie der Medulla oblongata vorhanden. Die verschiedenen serotonergen Zellgruppen der Rapheregion wurden von Dahlström und Fuxe (1964) entsprechend ihrer Lage im Hirnstamm und ihrer Projektionsgebiete mit B1 bis B9 bezeichnet (Abb. 2). Die rostralen Neurone kommen aus dem Nucleus raphe pontis (B5), Nucleus raphe dorsalis (B6/B7), Nucleus centralis superior (B8), und Nucleus tegmenti reticularis pontis (B9). Die caudalen Neurone bestehen aus dem Nucleus raphe pallidus (B1 und B4), obscurus (B2) und magnus (B3) (Rubenstein, 1998; Jacobs und Azmitia, 1992; Golidis und Rohrer, 2002).

Die serotonergen Neurone der rostralen Raphekerne projizieren ihre Fasern aufsteigend ins gesamte Vorderhirn wie z.B. in den Cortex, das Striatum, die Amygdala, den Thalamus, den Hypothalamus, den Hippocampus, die Substantia nigra, den suprachiasmatischen Nucleus und das Kleinhirn. Die aufsteigenden serotonergen Innervierungen des Vorderhirns kommen hauptsächlich aus zwei Regionen des Mesencephalons: den Nuclei raphe dorsalis und medianus. Der Nucleus raphe dorsalis innerviert das Striatum, den Frontalcortex, und das laterale Septum, während der Nucleus raphe medianus den dorsalen und ventralen Hippocampus, Hypothalamus, und das mediane Septum innerviert. Die am caudalsten liegenden serotonergen Gruppen (B1-B4) sind Ursprung der absteigenden serotonergen Projektion in den Hirnstamm, ins Rückenmark und in die Medulla oblongata (Knobelman et al., 2001a; Roberts et al., 2001).

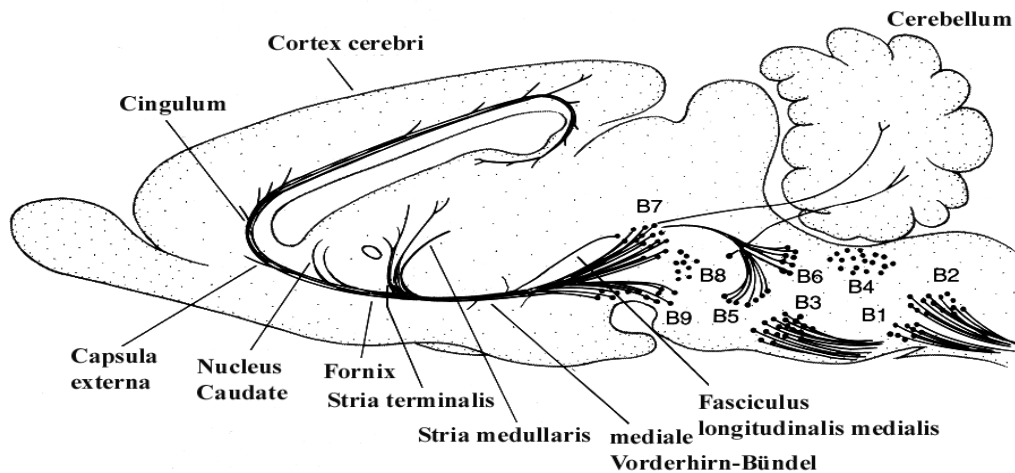


Abb. 2 Serotonerge Neurone im Hirnstamm der adulten Ratte (nach Role und Kelly, 1991). **B1** und **B4**: Nucleus raphe pallidus; **B2**: Nucleus raphe obscurus, **B3**: Nucleus raphe magnus; **B5**: Nucleus raphe pontis; **B6** und **B7**: Nucleus raphe dorsalis; **B8**: Nucleus centralis superior; **B9**: Nucleus tegmenti reticularis pontis.

1.1.3 Wachstum und Entwicklung des serotonergen Systems im Gehirn

Das serotonerge System entwickelt sich relativ früh im Gehirn der Säugetiere und ist eines der phylogenetischen ältesten Neurotransmittersysteme (Lauder et al., 1982). Bei der Maus können serotonerge Neurone im Gehirn von Embryonen erstmalig am Embryonaltag (E) 11,5 (Abb. 3) immunhistochemisch mit dem 5-HT Antikörper detektiert werden (Briscoe et al., 1999). Mehr ist über die Entwicklung des serotonergen Systems in der Ratte bekannt. Die rostralen serotonergen Neuronengruppen werden am frühesten bei E12 Embryonen identifiziert und bei E13 Embryonen haben die Raphe Neurone die letzte Zellteilung abgeschlossen und beginnen mit der Synthese von 5-HT. In den caudalen Neuronengruppen kann die Immunreaktivität von 5-HT erst bei E14 Embryonen nachgewiesen werden, obwohl diese Neurone etwa zum gleichen Zeitpunkt (E11-12) wie die rostralen Neurone entstanden sind, aber möglicherweise noch nicht zur 5-HT-Synthese befähigt sind (Rubenstein, 1998). Zum Zeitpunkt E19 ist die Verteilung aller Neuronengruppen in der Raphe ähnlich wie bei den adulten Ratten und die Entwicklung serotonerger Neurone nahezu beendet (Lauder et al., 1974). Von E21 bis frühpostnatale Periode entwickeln sich die serotonergen Neuronengruppen und die einzelnen serotonergen Neurone durch die Veränderung der zellulären Dichte und der dendritischen Architektur weiter (Whitaker-Azmitia, 2001; Lidov und Molliver, 1982a; Lauder et al., 1982).

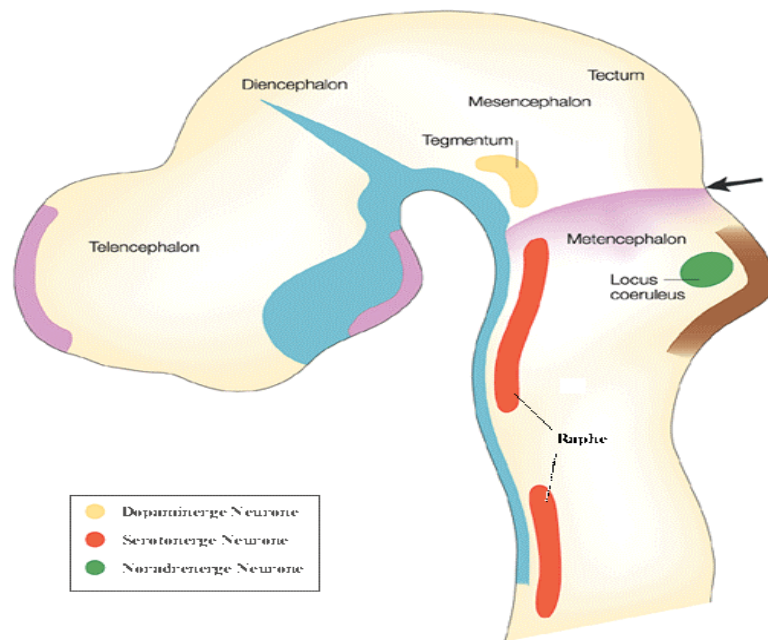


Abb. 3 Embryonale Verteilung serotonerger, dopaminerger und noradrenerger Neurone (nach Goridis und Rohrer, 2002). Die sagittale Ansicht des Neuralrohrs der Maus am Embryonaltag 11,5 wird gezeigt. Die serotonergen Neurone sind in der Raphe, die dopaminergen Neurone im Tegmentum des Mesencephalons und die noradrenergen Neurone im Locus coeruleus lokalisiert. Der Pfeil zeigt die Grenze vom Mesencephalon und Metencephalon.

Die Entwicklung serotonerger Neurone im Gehirn der Ratten wird in drei Perioden eingeteilt: (1) anfängliche Verlängerung der Axone (E13-E15); (2) die Entwicklung der selektiven Bahnen (E16-E19); (3) die Entwicklung der serotonergen Innervierung in den Terminalregionen (E19-P21). Von E19 bis postnataler Tag (P) 21 nimmt 5-HT im Gesamthirn am schnellsten zu (Lidov et al., 1982). Der Nucleus raphe rostralis projiziert seine Axone aufsteigend ins Mesencephalon und Vorderhirn, und der Nucleus raphe caudalis absteigend ins Rückenmark (Molliver et al., 1987; Rubenstein, 1998). Gleich nach dem Erscheinen der Immunreaktivität von 5-HT im Hirnstamm ist die rostrale Projektion ganz deutlich erkennbar. Zum Zeitpunkt E14 der Ratte projizieren die Axone von den rostralen serotonergen Neuronengruppen aufsteigend ins caudale Mesencephalon und die aufsteigenden Axone treffen bei E15 Embryonen im Diencephalon und bei E17 Embryonen im Telencephalon ein. Zum Zeitpunkt E19 kommen die aufsteigenden serotonergen Axone durch die medialen Vorderhirn-Bündel im Pallium, dann im anteromedialen, frontalen und lateralen Cortex an. Zu diesem Zeitpunkt erscheinen serotonerge Innervierungen im Hippocampus. Die serotonerge

Innervierung des Striatums erfolgt erst in späteren Entwicklungsstadien. Zum Zeitpunkt P1 - P3 sind noch kaum serotonerge Fasern erkennbar. Erst zum Zeitpunkt P14 zeigt das gesamte Striatum. Die absteigenden 5-HT Innervierungen erreichen bei E14 Embryonen das Rückenmark und innervieren die präganglionären sympathischen Neurone und somatischen Motoneurone, und zum Zeitpunkt E17 beginnen sie mit der Bildung von Synapsen (Lidov und Molliver, 1982b; Rubenstein, 1998).

1.1.4 Rolle von 5-HT während der Entwicklung des serotonergen Systems und dessen Projektionsgebiete

Es gibt Hinweise dafür, dass 5-HT nicht nur die Entwicklung des serotonergen Systems, sondern auch die Entwicklung der Neurone in den Projektionsgebieten beeinflusst. Bei Hemmung der 5-HT-Synthese mit p-Chlorophenylalanin (pCPA), einem irreversiblen Hemmstoff der TPH, in den früheren Entwicklungsstadien der embryonalen Ratte kommt es zu einer dauerhaften Reduzierung der Neurone im Hippocampus und Cortex des adulten Gehirns. In der späteren Entwicklungsphase spielt 5-HT eine Rolle in der dendritischen Entwicklung, einschließlich der dendritischen Länge, und der Verzweigung im Hippocampus und Cortex. Bei der adulten Ratte führt die Hemmung der 5-HT-Synthese zum Verlust von Dendriten (Whitaker-Azmitia et al., 1995; 2001).

Während der Entwicklung des Gehirns spielt 5-HT mindestens zwei Rollen: (1) 5-HT beeinflusst über eine Autoregulation die Entwicklung serotonerger Neurone selbst (Whitaker-Azmitia und Azmitia, 1986; Shemer et al., 1991) und ist als ein Entwicklungssignal für die Ontogenese des serotonergen Systems angesehen (Lauder, 1990) und die Veränderung des 5-HT Spiegels kann die Morphologie des serotonergen Systems ändern. Eine vorrangige Wirkung ist die Hemmung des Auswuchses der serotonergen Terminale. (Whitaker-Azmitia et al., 1990). (2) 5-HT ist an der Regulation der Entwicklung und Reifung der Neurone in den serotonergen innervierten Terminalgebieten beteiligt. Zum gleichen Zeitpunkt der Einwanderung serotonerger Fasern in die Zielregionen erfolgt die Proliferation und Differenzierung der neuronalen und glialen Vorstufen, Neurogenese, Zellwanderung, Verfeinerung der Dendriten, Myelinisierung der Axone und Synaptogenese. Einige dieser Prozesse sind von der Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie S100 β aus den Astrozyten in den Terminalgebieten abhängig (Daval et al., 1987; Lauder et al., 1982; 1983; Azmitia et al., 1990; Azmitia, 1996; Whitaker-

Azmitia, 2001). 5-HT beeinflusst auch das Überleben und die Reifung der postsynaptischen Neurone in den Zielgebieten (Lauder und Krebs, 1978; Hery et al., 1999).

So konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von 5-HT in den sich entwickelnden serotonergen Neuronen durch Behandlung der trächtigen Ratte mit pCPA zu einer Verzögerung sowohl des Beginns der Differenzierung (Zeit der letzten Zellteilung) der serotonergen Neurone des Nucleus raphe dorsalis als auch der mesencephalen dopaminergen Neurone, die sich entlang der serotonergen Bahn entwickeln, führt. Im Gegensatz dazu, ruft der tägliche Stress durch die maternale Vehikel-Injektion bei den Kontrolltieren einen früheren Beginn der neuronalen Differenzierung in den gleichen Regionen hervor. Dies deutet darauf hin, dass 5-HT als ein Differenzierungssignal für die entsprechenden embryonalen Zielzellen dient (Lauder et al. 1982).

1.1.5 Funktionen des serotonergen Systems im Gehirn

Die Zellkörper der serotonergen Neurone der Rapheregion projizieren praktisch in alle Regionen des Gehirns und ins Rückenmark. So erklärt sich die Beteiligung von 5-HT an zahlreichen zentralnervösen Funktionen. 5-HT ist an vielen verschiedenen Funktionen des Gehirns beteiligt, einschließlich der Regulation der Entwicklung des Gehirns (s. 1.1.4; Azmitia, 2001).

5-HT beeinflusst unterschiedliche physiologische Funktionen, wie die Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus, der Nahrungsaufnahme, der Schmerzwahrnehmung, der Körpertemperatur, der Gedächtnisbildung sowie der Stimmung, der Kognition und der Kontrolle des Angstverhaltens (Rubenstein, 1998). Das serotonerge System im Gehirn wird als ein bedeutsamer Modulator von Stimmungsvorgängen angesehen. Die Störungen des serotonergen Systems im ZNS sind an der Entstehung verschiedener neuropsychiatrischer und neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt, wie Angstverhalten, Depression, affektive Störungen und Schizophrenie, Zwangsstörungen sowie Parkinson'sche und Alzheimer'sche Erkrankung und neurovaskuläre Phänomene im Rahmen der Migräne. (Heisler et al., 1998 ; Whitaker-Azmitia, 2001).

1.1.6 Einfluss von S-100β auf das serotonerge System

Wie oben genannt ist das serotonerge System für die Entwicklung des Gehirns von großer Bedeutung. Deswegen ist es auch sehr wichtig, Faktoren zu kennen, welche das serotonerge

System beeinflussen können. Neben der Autoregulation durch 5-HT können eine Reihe von anderen Faktoren die Entwicklung und Differenzierung des serotonergen Systems beeinflussen. 5-HT stimuliert die in den Astrogliazellen lokalisierten 5-HT_{1A} Rezeptoren und führt zur Proliferation der Glia, Produktion und Freisetzung von Astrogliafaktoren wie S-100 β Protein und Fibroblastenwachstumsfaktor-5, die einen neurotrophen Effekt auf serotonerge Neurone haben (Azmitia et al., 1990; Whitaker-Azmitia und Azmitia, 1986; Whitaker-Azmitia et al., 1990; 1996; Ueda et al., 1994; Nishi et al., 2000).

S-100 Protein wurde erstmalig 1965 von Moore vorgestellt (Moore, 1965; Whitaker-Azmitia, 1990). S-100 Protein ist ein saures, lösliches, Calcium-bindendes Protein und wird von den Astrogliazellen synthetisiert und freigesetzt (Kligman und Hilt, 1988; Marshak, 1990). Es ist ein Dimer aus zwei Untereinheiten, von denen jede ein Molekulargewicht von 10000 kDa hat (Isobe und Okuyama, 1981). Die im ZNS funktionsfähige Struktur von S-100 ist vor allem das Homodimer $\beta\beta$ (S-100 β). S-100 β hat Effekte auf die Entwicklung und Plastizität des Gehirns und spielt eine wichtige Rolle im Überleben von Neuronen, in der Synaptogenese und Verlängerung der Neuriten von corticalen Neuronen (Kligman und Marshak, 1985; Winningham-Major et al., 1989), serotonergen Neuronen des Hirnstamms (Azmitia et al., 1990), Motoneuronen des Rückenmarks (Bhattacharyya et al., 1992), und Neuronen der Hinterwurzel (Van Eldik et al., 1991).

S-100 β hat signifikante und selektive Effekte auf das Terminalwachstum der serotonergen Neurone. Die Entwicklung der 5-HT Terminale ist von dem Gleichgewicht der positiven und negativen Einflüsse abhängig. Der Auswuchs der 5-HT Terminale ist von einer Reihe von Wachstumsfaktoren wie dem aus den Astrogliazellen stammenden S-100 β Protein in den Zielgebieten abhängig. Auf diese Weise beeinflusst 5-HT indirekt das Wachstum der serotonergen Neurone. Andererseits hat 5-HT auch einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum serotonerger Neurone über eine direkte Wirkung - serotonerge Rezeptoren an den serotonergen Nervendigungen. Daraus wird ersichtlich, dass 5-HT nicht nur die Entwicklung der Zielgebiete, sondern auch die Entwicklung der eigenen Neurone reguliert (Whitaker-Azmitia, 2001). Kurz gesagt, ist 5-HT ein Regulierungs- und Entwicklungssignal für das serotonerge System (Lauder, 1990). S-100 β scheint selektiv für den serotonergen Phänotyp der monoaminergen Neurone zu sein, weil S-100 β das Wachstum der serotonergen Neurone, nicht aber der dopaminergen Neurone fördert (Whitaker-Azmitia et al., 1996).

1.2 5-HT Rezeptoren

Die Effekte des serotonergen Systems im ZNS werden über mindestens 14 verschiedene serotonerge Rezeptorsubtypen vermittelt (Borella et al., 1997; Riad et al., 1994; Sikich et al., 1990; Whitaker-Azmitia et al., 1990; 1994). Zur Zeit werden die 5-HT Rezeptoren entsprechend der pharmakologischen Profile, cDNA- abgeleiteten primären Sequenzen und Mechanismen der Signaltransduktion in sieben Familien eingeteilt und in der letzten Dekade wurden mehr als 14 Subtypen durch pharmakologische Methoden differenziert und molekulare biologische Techniken geklont, der Reihe nach geordnet und weitgehend im ZNS der Säugetiere identifiziert (Saudou und Hen, 1994; Barnes und Sharp, 1999; Hoyer und Martin, 1997). Unter diesen vielfältigen Rezeptoren erhalten die 5-HT_{1A} Rezeptoren die größte Aufmerksamkeit, weil die 5-HT_{1A} Rezeptoren möglicherweise auch der Angriffspunkt von wirkungsvollen Medikamenten gegen affektive Erkrankungen wie Angstverhalten und Depression sein könnten (Briner und Dodel, 1998; Parks et al., 1998; Apter und Allen, 1999).

1.2.1 Eigenschaften des 5-HT_{1A} Rezeptors

Das 5-HT_{1A} Rezeptor-Protein besteht sowohl bei Säugetieren als auch beim Homo sapiens aus 422 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von $\approx 46\,000$ und eine sieben transmembranöse Domänen-Struktur. Mit Ausnahme der 5-HT₃ Rezeptoren, die direkt an der Öffnung von Ionenkanälen beteiligt sind, gehören die 5-HT_{1A} Rezeptoren wie die anderen 5-HT Rezeptoren zu der Unterfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und hemmen so die Adenylatcyclase. Die Bindung von 5-HT an 5-HT_{1A} Rezeptoren führt zur Öffnung von K⁺-Kanälen und Hyperpolarisation und hemmt damit die Aktivität der serotonergen Neurone. (Aghajanian et al., 1990; Jacobs und Azmitia, 1992; Hamon, 1997; Barnes und Sharp, 1999; Raymond et al., 1999).

Die Entwicklungsstudie von Hillion et al. (1994) hat gezeigt, dass die 5-HT_{1A} Rezeptoren sehr früh in dem embryonalen Gehirn der Ratte vorkommen. Die 5-HT_{1A} Rezeptor mRNA wurde erstmalig in primären neuronalen Zellkulturen des Hirnstamms, die zum Zeitpunkt E12 kultiviert wurden, entdeckt, während das Rezeptor Protein erst in Kulturen, die zwei Tagen später zum Zeitpunkt E14 gewonnen wurden, erschien.

1.2.2 Verteilung des 5-HT_{1A} Rezeptors im Gehirn

Die Verteilung der 5-HT_{1A} Rezeptoren im ZNS wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht und durch verschiedene autoradiographische Studien mit unterschiedlichen Radioliganden wie 8-Hydroxy-2-[N-Dipropylamino] Tetralin ([³H]8-OH-DPAT, Pazos und Palacios, 1985) und [³H] N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1- Piperazinylethyl]-N-(2-Pyridinyl) Cyclohexan Carboxamid ([³H] WAY 100635; Gozlan et al., 1995) dargestellt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich 5-HT_{1A} Rezeptoren besonders reichlich im Hippocampus, lateralen Septum, Frontal- und Entorhinalcortex und Nucleus raphe rostralis befinden. Außerdem sind noch 5-HT_{1A} Rezeptoren in dem dorsalen Horn des Rückenmarks, der Amygdala, einigen Nuclei des Thalamus und Hypothalamus, und dem lateralen Striatum lokalisiert. In dem Globus pallidum, der Substantia nigra und dem Cerebellum sind die 5-HT_{1A} Rezeptoren kaum oder undetektierbar (Pazos und Palacios, 1985; Verge et al., 1986; Radja et al., 1991; Hamon, 1997; Barnes und Sharp, 1999).

Die Verteilung der Radioliganden Bindungsstellen der 5-HT_{1A} Rezeptoren stimmt mit der von der 5-HT_{1A} Rezeptor mRNA, die durch *in situ* Hybridisierung von spezifischen Oligonucleotiden oder cRNA Proben sichtbar gemacht wurde, überein (Miquel et al., 1991; Pompeiano et al., 1992; Hamon, 1997). Eine sehr ähnliche Verteilung der 5-HT_{1A} Rezeptor-Proteine wurde auch immunhistochemisch nachgewiesen (Kia et al., 1996a). Eine selektive Läsion serotonerger Neurone mittels des Neurotoxins 5,7-Dihydroxytryptamin (5,7-DHT) führt nur in den Rapheregionen zur Reduzierung der Bindungsstellen für Radioliganden (Verge et al., 1985) und der mRNA des 5-HT_{1A} Rezeptors (Miquel et al., 1992). Es wird darauf hingewiesen, dass 5-HT_{1A} Autorezeptoren hauptsächlich somatodendritisch in den Nuclei raphe, und nur wenig an den Terminalen der serotonergen Projektionsregionen lokalisiert sind (Roberts et al., 2001). Eine Studie zur ultrastrukturellen Verteilung des 5-HT_{1A} Rezeptors hat gezeigt, dass dieser Rezeptor sowohl an synaptischen Membranen als auch extrasynaptisch liegt (Kia et al., 1996b). 5-HT_{1A} Rezeptoren befinden sich auch an Gliazellen des Gehirns (Azmitia et al., 1996).

1.2.3 Funktionen des 5-HT_{1A} Rezeptors im Gehirn

Im Gehirn der Säugetiere unterscheidet man zwei Gruppen von 5-HT_{1A} Rezeptoren und jede Gruppe spielt eine unterschiedliche Rolle im ZNS. Eine Gruppe existiert als präsynaptischer, inhibitorischer Autorezeptor an Dendriten und Zellsomata serotonerger Neurone in den

Rapheregionen und ist an der Regulation des serotonergen Systems beteiligt (Verge et al., 1986; Sotelo et al., 1990; Kia et al., 1996a; Hamon, 1997). Die Aktivierung des 5-HT_{1A} Autorezeptors hemmt die Aktivität der serotonergen Neurone und reduziert die Synthese, den Umsatz und die Freisetzung von 5-HT in den Projektionsbereichen der serotonergen Neurone wie im Frontalcortex, Hippocampus und Striatum (Blier und de Montigny, 1987; Sprouse und Aghajanian, 1987; Kennett, et al., 1987; Sharp und Hjorth, 1990; Hjorth und Sharp, 1991; Kreiss und Lucki, 1994; Knobelman et al., 2000; 2001a; He et al., 2001). Die andere Gruppe von 5-HT_{1A} Rezeptoren ist postsynaptisch an vielen nicht-serotonergen Neuronen in den serotonergen innervierten Zielgebieten des Vorderhins wie z.B. im Hippocampus, Septum und Cortex lokalisiert. Wie bei den präsynaptischen Rezeptoren kann die Aktivierung des postsynaptischen 5-HT_{1A} Rezeptors zur Hemmung der Aktivität der postsynaptischen nicht serotonergen Neurone im Vorderhirn führen (Sprouse und Aghajanian, 1988; Gross et al., 2000).

Der 5-HT_{1A} Rezeptor ist auch möglicherweise an der Differenzierung von serotonergen Neuronen während der embryonalen Entwicklung beteiligt. Zumindest konnte in primären Raphe-Zellkulturen der E14 Ratte gezeigt werden, dass die Zahl der TPH-immunreaktiven Zellen durch eine Behandlung mit 5-HT für 4 Tage dosis-abhängig zugenommen hat. Diese Entwicklung des serotonergen Phänotyps in den primären Zellkulturen wurde über Aktivierung des 5-HT_{1A} Rezeptors vermittelt (Galter und Unsicker, 2000). Der 5-HT_{1A} Rezeptor ist auch an der Freisetzung des Wachstumsfaktors S100 β aus Astrozyten beteiligt, wie in primären Astrozytenkulturen gezeigt werden konnte (Riad et al., 1994). Dies ist ein Hinweis dafür, dass der 5-HT_{1A} Rezeptor möglicherweise eine neurotrophische Rolle in der Entwicklung des Gehirns und auch im adulten Gehirn hat (Riad et al., 1994; Azmitia et al., 1996).

1.3 5-HT_{1A} Rezeptor Knockout (KO) Maus

Um die Funktionen des serotonergen Systems genauer zu definieren, haben Wissenschaftler ein spezifisches Angebot der molekularen Biologie verwendet (Lucas und Hen, 1995). Die Anwendung der transgenen Technik an der Maus hat die Herstellung von inaktiven Mutationen verschiedener 5-HT Rezeptoren, 5-HT Transporter und von der MAO A ermöglicht. Durch transgene Veränderungen am serotonergen System konnten neue Einblicke in die Rolle der verschiedenen Komponenten des serotonergen Systems gewonnen werden. Diese neuen Erkenntnisse könnten auch für das Verständnis von psychiatrischen Erkrankungen von

Bedeutung sein (Murphy et al., 1999; Phillips et al., 1999; Sibille und Hen, 2001; Gingrich und Hen, 2000; 2001; Toth, 2003).

Im Jahr 1998 wurden die 5-HT_{1A} Rezeptor Knockout-Mäuse (KO Mäuse) unabhängig von drei verschiedenen Arbeitsgruppen erzeugt. Obwohl die KO Mäuse mit verschiedenen genetischen Hintergründen gezüchtet wurden, berichteten alle drei Gruppen, dass die KO Mäuse erhöhtes Angstverhalten aufweisen (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998). Die KO Mäuse zeigen bei verschiedenen Verhaltenstests eine erhöhte Ängstlichkeit, versuchen eine neue und furchterzeugende Umgebung zu vermeiden und stressvollen Situationen auszuweichen (Parks et al., 1998; Zhuang et al., 1999; Richer et al., 2002). Wegen des Verlusts der 5-HT_{1A} Rezeptoren in den Nuclei raphe mangelt es bei KO Mäusen an der negativen Rückkoppelung. Es wird darauf hingewiesen, dass das Angstverhalten bei KO Mäusen durch das Fehlen der wichtigen präsynaptischen Regulation der Freisetzung von 5-HT und die daraus resultierende Zunahme der 5-HT Neurotransmission in den Projektionsterminalregionen der Raphe Neuronen hervorgerufen wird (Parks et al., 1998; He et al., 2001). Auch die inaktiven postsynaptischen 5-HT_{1A} Rezeptoren sind am veränderten Verhalten wie Angst beteiligt (Parks et al., 1998). Im Gegensatz dazu behaupteten Richer und Mitarbeiter (2002) aufgrund einer unveränderten Freisetzung von 5-HT bei KO Mäusen, dass das Angstverhalten bei KO Mäusen vorwiegend auf die fehlenden postsynaptischen 5-HT_{1A} Rezeptoren zurückzuführen ist.

Bei KO Mäusen sind sowohl die präsynaptischen 5-HT_{1A} Rezeptoren als auch die postsynaptischen 5-HT_{1A} Rezeptoren inaktiv. Bis vor kurzem war es noch schwer zu beurteilen, ob der Ausfall der präsynaptischen 5-HT_{1A} Rezeptoren oder der postsynaptischen Rezeptoren für die Zunahme des Angstverhaltens bei KO Mäusen verantwortlich ist (Gross et al., 2002; He et al., 2001). Um die Rolle von prä- und postsynaptischen 5-HT_{1A} Rezeptoren in der Erhöhung des Angstverhaltens zu differenzieren, haben Gross und Mitarbeiter bei KO Mäusen eine gewebsspezifische und konditionelle Rettung des 5-HT_{1A} Rezeptors während der frühen postnatalen Periode (P5-P21) im Cortex und Hippocampus durchgeführt. Durch die postnatale Expression der 5-HT_{1A} Rezeptoren im Vorderhirn konnte die Zunahme des Angstverhaltens verhindert werden. Diese Befunde sprechen dafür, dass die postsynaptischen 5-HT_{1A} Rezeptoren eine kritische Rolle in der Modulierung des Angstverhaltens spielen und die Expression der 5-HT_{1A} Rezeptoren während der frühpostnatalen Perioden sehr wichtig für die Etablierung des normalen Angstverhaltens in der adulten Maus ist (Gross et al., 2002).

1.4 Pharmakologische Aktivierung des 5-HT_{1A} Rezeptors

Viele *in vivo* Mikrodialyse-Studien haben gezeigt, dass bei der Ratte die systemische Behandlung mit selektiven 5-HT_{1A} Rezeptor Agonisten wie 8-OH-DPAT zur Reduktion von extrazellulärem 5-HT in dem Frontalcortex, Striatum, Hippocampus, Septum und den anderen Terminalregionen führen kann (Hjorth und Sharp, 1991; Kreiss und Lucki, 1994). Solche Effekte werden durch die Aktivierung der präsynaptischen 5-HT_{1A} Rezeptoren hervorgerufen, weil ähnliche Effekte auch durch die lokale Infusion von 8-OH-DPAT in die Kerne der Raphe ausgelöst werden. Die Behandlung mit selektiven 5-HT_{1A} Rezeptor Antagonisten wie WAY 100635 und p-MPPI [4-(2'-Methoxyphenyl)-1-[2'-[N-(2"-pyridinyl)-p-iodo-benzamido] ethyl] piperazin] kann die Effekte von 8-OH-DPAT verhindern (Assie und Koek, 1996; Allen et al., 1997; Knobelmann et al., 2000).

Die Aktivierung des 5-HT_{1A} Rezeptors durch Agonisten vermittelt einen anxiolytischen Effekt (Lucki, et al., 1994; De Vry, 1995). Korrelationen zwischen der Zeit- und Dosisabhängigkeit der anxiolytischen Wirkung, der Hemmung der Aktivität der serotonergen Neurone im Nucleus raphe dorsalis und der Hemmung der Freisetzung von 5-HT in verschiedenen Projektionsregionen wurden nach der systemischen Gabe von Agonisten gefunden (Jolas et al., 1995; Sommermeyer et al., 1993).

1.5 Überexpression des 5-HT_{1A} Rezeptors in der Maus

Aufgrund der pharmakologischen Hinweise und des erhöhten Angstverhaltens bei KO Mäusen ist zur weiteren Abklärung der Rolle des 5-HT_{1A} Rezeptors bei der Regulierung von Verhaltensvorgängen eine transgene Methodik verwendet worden, die zu einer Überexpression des 5-HT_{1A} Rezeptors in der Maus führte (Kusserow et al., 2003).

Ein 4,5 kb Promoter-Fragment des 5-HT_{1A} Rezeptors wurde für die Expression in den Hirnregionen, wo 5-HT_{1A} Rezeptoren lokalisiert sind, verwendet. Mit diesem Promoter-Fragment wurde eine transgene Maus-Linie, deren 5-HT_{1A} Rezeptoren überexprimiert werden, erzeugt. Die neuronale Spezifität des Promoter-Fragments und die spezifische Expression im ZNS wurden durch *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen mit dem gleichen 4,5 kb Promoter-Fragment, das an das lacZ Gen gebunden ist, nachgewiesen.

Die homozygoten 5-HT_{1A} Rezeptor überexprimierenden Mäuse (ÜE Mäuse) unterscheiden sich von Wild-Typ (WT) Mäusen in verschiedenen Verhaltenstests und physiologischen

Parametern wie Körpertemperatur. Bei den homozygoten ÜE Mäusen konnte mittels einer Rezeptorautoradiographie in der frühpostnatalen Periode eine transiente Erhöhung der 5-HT_{1A} Rezeptor-Dichte nachgewiesen werden. Die adulten homozygoten ÜE Mäuse zeigen ein weniger ausgeprägtes Angstverhalten als WT Mäuse. Ein weiterer Phänotyp, der auf eine Überexpression des 5-HT_{1A} Rezeptors spricht, ist die deutlich niedrigere Körpertemperatur als bei WT Mäusen. Heterozygote Mäuse sind im Phänotypus von WT Mäusen nicht unterscheidbar (Kusserow et al., 2003).

1.6 Catecholaminerge Systeme im Gehirn

Da sowohl in der embryonalen Entwicklung des Gehirns als auch im adulten Gehirn eine enge Interaktion zwischen dem serotonergen System und den catecholaminergen Systemen besteht, konzentrierte sich unsere Studie auch auf diese Systeme.

1.6.1 Aufbau und Funktion der catecholaminergen Systeme

Die catecholaminergen Neurone produzieren ihre Neurotransmitter Dopamin (DA), Noradrenalin (NA), oder Adrenalin aus der Aminosäure Tyrosin über eine Reihe von enzymatischen Reaktionen (Abb.4). Bis zum DA ist die Synthese dieser drei Catecholamine identisch. Welches Catecholamin gebildet wird hängt von der Enzym-Ausstattung in der jeweiligen Zelle ab. In dopaminergen Neuronen hört die Synthese bei DA auf, während in noradrenergen Neuronen DA zu NA und in adrenergen Neuronen und Nebennierenmarkszellen zu Adrenalin weiter umgewandelt wird.

Der vesikuläre Monoamintransporter transportiert Monoamine im Austausch gegen Protonen in die Vesikel und ist bei den Vesikeln der dopaminergen, noradrenergen, adrenergen und serotonergen Neurone identisch. Für den Abbau der Catecholamine sind die Enzyme MAO A oder B und die Catechol-O-Methyltransferase im wesentlichen verantwortlich. Die Abbau-produkte von DA sind 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure, von NA 4-Hydroxy-3-Methoxyphenylethylenglycol und Normetanephrin.

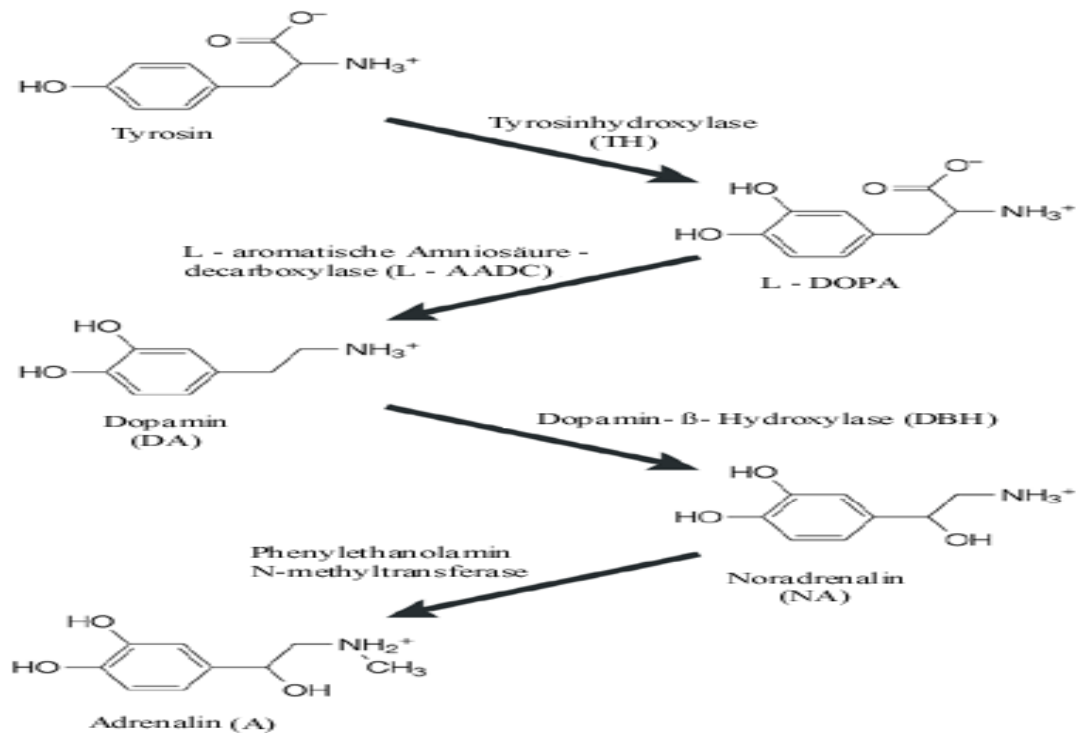


Abb. 4 Synthese von Catecholaminen

1.6.2 Verteilung der catecholaminergen Systeme

DA ist nicht nur Vorstufe von NA und Adrenalin, sondern auch ein bedeutsamer Neurotransmitter im Gehirn. Die dopaminergen Neurone der adulten Säugetiere werden in neun verschiedene Gruppen eingeteilt und die wichtigste Gruppe befindet sich vor allem im ventralen Mesencephalon, wo die dopaminergen Neurone im Nucleus retrorubralis (A8), in der Substantia nigra (A9) und im ventralen Tegmentum (A10; Abb.2 und Abb.5A), und auch im Diencephalon (A11-A15, Abb.5B) lokalisiert sind. Das Telencephalon enthält zwei kleinere dopaminerge Neuronengruppen, die sich im Bulbus olfactorius (A16) und in der Retina (A17) befinden (Dahlström und Fuxe, 1964; Hynes und Rosenthal, 1999. Abb.5B). Folgende dopaminerge Systeme sind von besonderer Bedeutung: (1) mesostriatales System: von der Substantia nigra und dem ventralen Tegmentum projizieren dopaminerge Neurone in das Striatum, den Globus pallidus, den Nucleus subthalamicus, den Neocortex, den Nucleus accumbens, den Bulbus olfactorius, und den Nucleus stria terminalis (Abb.5A). Degeneration des nigrostriatalen Systems führt zur Parkinson'schen Erkrankung. (2) mesolimbisches und mesocorticales System: vom ventralen Tegmentum projizieren das mesolimbische und mesocorticale System in die limbischen und corticalen Systeme einschließlich Cingulärcortex, Habenula, limbischen

Hirnstamm-Regionen, Septum, Amygdala, Pyriform- und Entorhinalcortex, Locus coeruleus (Abb.5B)

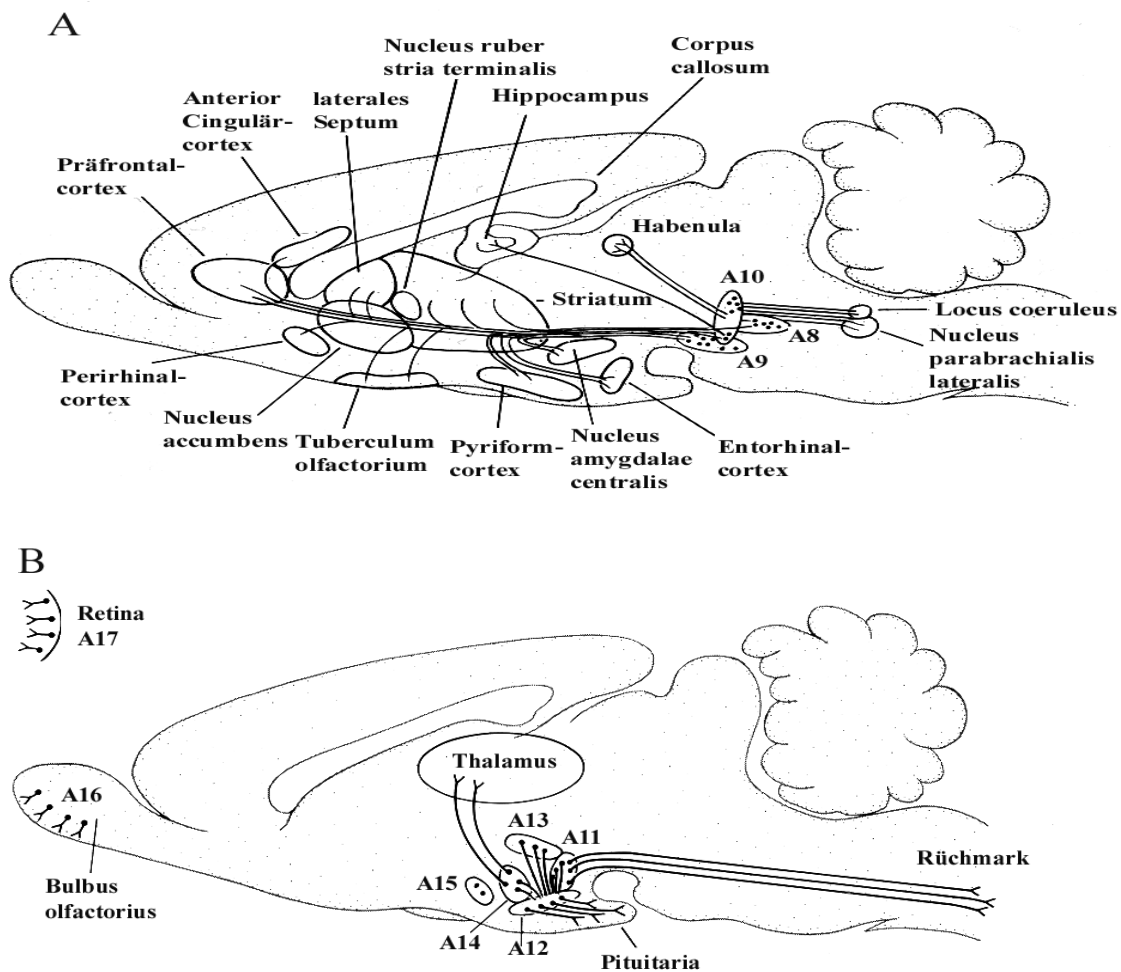


Abb. 5 Dopaminerge Neurone im ZNS der adulten Ratte (nach Cooper et al., 1991). **A:** Die mesostriatalen und mesolimbocorticalen Systeme sind in **A8** (Nucleus retrorubralis), **A9** (Substantia nigra), und **A10** (ventrales Tegmentum) lokalisiert. **B:** Weitere dopaminerge Neurone befinden sich in dem Diencephalon (**A11-A15**), dem Bulbus olfactorius (**A16**) und der Retina (**A17**).

Im ZNS der Säugetiere ist NA ebenfalls ein wichtiger Neurotransmitter und das noradrenerge System gehört zu den am weitesten ausbreiteten Systemen. Wie die Klassifizierung der dopaminergen Neurone werden die noradrenergen Neurone in die Gruppen A1-A7 eingeteilt (Hynes und Rosenthal, 1999). Die noradrenergen Neurone bilden unterschiedliche mesencephale Nuclei im LC (A4 und A6) und eine Reihe von locker organisierten Zellgruppen, die im gesamten Hinterhirn verteilt sind (A1-A3, A5 und A7).

Die noradrenergen Neurone im LC projizieren in nahezu alle Hirnregionen und aufsteigend in das Diencephalon, Cerebellum, basale Vorderhirn und den Neocortex, absteigend in das Rückenmark und auch den Hirnstamm. Der LC erhält nur zwei große afferente Innervierungen von zwei Nuclei im Hirnstamm wie dem Nucleus paragigantocellularis und Nucleus hypoglossi prepositus (Role und Kelly, 1991; Abb.6).

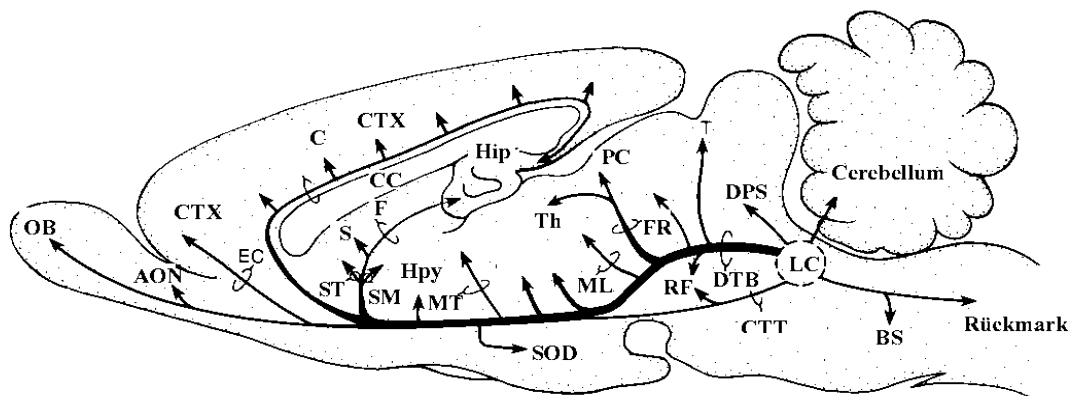


Abb. 6 Noradrenerge Neurone und Projektionen vom LC im Gehirn der adulten Ratte (nach Moore und Bloom, 1979). **BS:** Hirnstamm; **C:** Cingulum; **CC:** Corpus callosum; **CTT:** Tractus tegmentalis centralis; **CTX:** Cortex cerebri; **DPS:** dorsales periventriculares System; **DTB:** Tractus tegmentalis dorsalis; **EC:** Capsula externa; **F:** Fornix; **FR:** Fasciculus retroflexus; **Hyp:** Hypothalamus; **Hip:** Hippocampus; **LC:** Locus coeruleus; **MT:** Fasciculus mamilothalamicus; **ML:** Lemniscus medialis; **OB:** Bulbus olfactorius; **PC:** Commissura posterior; **RF:** Formatio reticularis; **Spt:** Septum; **SM:** Stria medullaris; **ST:** Stria terminalis; **T:** Tectum; **Th:** Thalamus.

1.6.3 Entwicklung der catecholaminergen Systeme

Die catecholaminergen Systeme erscheinen sehr früh in der Entwicklung des ZNS der Säugetiere. Mittels immunhistochemischer Technik werden die dopaminergen Neurone bei der Ratte erstmalig zum Zeitpunkt E13 im ventralen Prosencephalon detektiert. Zum Zeitpunkt E14 entwickeln sich zwei dopaminerge Neuronengruppen im ventralen Mesencephalon und Fasern sind in der Eminentia mediana nachweisbar. Bei E17 Embryonen projizieren die dopaminergen Neurone ins Striatum. Zum Zeitpunkt E21 erscheinen die ursprünglichen dopaminergen Neuronengruppen in der Substantia nigra compacta (Voorn et al., 1988). Bei der Maus wurden Tyrosinhydroxylase (TH) positive Zellen erstmalig zum Zeitpunkt E 8,5-9 mittels TH-

Antikörpern identifiziert. Zum Zeitpunkt E 9,5-10 nimmt die Zahl der dopaminergen Neurone schnell zu. Nach dem Zeitpunkt E13 kann man die zwei dopaminergen Neuronengruppen (A9 und A10) unterscheiden (Di Porzio et al., 1990). Die noradrenergen Neurone im LC kommen erstmalig bei den E 9 Mäusen vor (Steindler und Trosko, 1989; Goridis und Rohrer, 2002).

1.7 Interaktionen zwischen den monoaminergen Systemen

Es ist weitgehend bekannt, dass ausgeprägte Interaktionen zwischen dem serotonergen System und den catecholaminergen Systemen sowohl auf neuroanatomischem als auch funktionellem Niveau vorhanden sind (Hajós-Korcsok und Sharp, 1999a).

In Bezug auf das dopaminerge System wurde in *in vivo* Mikrodialyse-Studien nachgewiesen, dass die Freisetzung von DA im Präfrontalcortex (Iyer und Bradberry, 1996) und Striatum (Benloucif und Galloway, 1991; Yi et al., 1991; Benloucif et al., 1993; De Deurwaerdere et al., 1997) durch die Behandlung mit 5-HT oder dessen Agonisten gefördert wird, und extrazelluläres DA im Frontalcortex durch verschiedene 5-HT Rückaufnahmehemmer wie Fluoxetin, Clomipramin, Imipramin erhöht wird. Die systemische Behandlung bei der Ratte mit dem selektiven 5-HT_{1A} Rezeptor Agonist wie 8-OH-DPAT kann die Aktivität der dopaminergen Neurone erhöhen (Prisco et al., 1994).

Darüber hinaus konnten Hinweise mittels Autoradiographie (Leger und Descarries, 1978) und immunhistochemischer Methode (Pickel et al., 1977) gewonnen werden, dass die noradrenergen Neurone im LC dichte serotonerge Projektionen aufweisen und die Synthese von NA im LC durch 5-HT reguliert wird. Elektrophysiologische und biochemische Studien zeigten, dass 5-HT die NA Neurotransmission tonisch reguliert und eine Rolle in der Hemmung der Funktion noradrenerger Neuronen im LC spielt (Haddjeri et al., 1997; MacRac-Deguerce et al., 1982), weil die Beschädigung der serotonergen Neurone in der Raphe mit dem selektiven 5-HT Neurotoxin 5,7-DHT zur Erhöhung der spontanen Aktivität noradrenerger Neurone (Haddjeri et al., 1997) und der TH im LC führt (MacRac-Deguerce et al., 1982). Ebenso werden serotonerge Neurone der dorsalen Raphe intensiv durch noradrenerge Projektionen vom LC innerviert (Anderson et al., 1977; Baraban und Aghajanian, 1981). Die Aktivität der serotonergen Neurone wird durch die Aktivierung des α_1 -adrenergen Rezeptors erhöht (Baraban und Aghajanian, 1980; Szabo et al., 1999), während die Aktivierung des α_2 -adrenergen Rezeptors oder die Behandlung mit den α_1 -adrenergen Rezeptor-Antagonisten die Aktivität reduziert (Mongeau et al., 1997).

1.8 Einfluss serotonerger Neurone auf die embryonale Entwicklung anderer Neurotransmittersysteme

Die Tatsache, dass serotonerge Fasern die Zielregionen sehr früh erreichen, hat zur Hypothese geführt, dass 5-HT die Entwicklung und Reifung der Zielneurone mitbeeinflusst. So konnte z.B. in organotypischen Schnittkulturen des embryonalen cerebralen Cortex gezeigt werden, dass 5-HT die Differenzierung der Glutamatneurone fördert (Lavdas et al., 1997). Lauder et al. (1982) haben beobachtet, dass die Hemmung der 5-HT-Synthese durch pCPA im embryonalen Gehirn zu einer verzögerten neuronalen Genese in serotonergen Projektionsgebieten führt. Diese Verzögerung war auch in der Region der sich entwickelnden Substantia nigra, durch die serotonerge Axone passieren, nachweisbar. Auf diesem Wege könnte 5-HT die Genese dopaminerger Neurone beeinflussen. Da noradrenerge Neurone im LC dichte serotonerge Projektionen aufweisen, könnte eine ähnliche Wirkung auch bei der Genese noradrenerger Neurone auftreten.

2 FRAGESTELLUNG

Das serotonerge System ist eines der sich am frühesten entwickelnden und am weitesten verbreitenden Systeme im Gehirn und spielt eine bedeutsame Rolle in einer Reihe von Funktionen des ZNS und beeinflusst verschiedene physiologische Funktionen. Zudem sind Störungen des serotonergen Systems bei vielen neuropsychiatrischen und neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt, z.B. bei Angstzuständen, Depressionen, Aggression sowie bei Parkinson'scher und Alzheimer'scher Erkrankung.

5-HT selbst ist nicht nur als ein weitverbreiteter Neurotransmitter, sondern auch als ein wichtiger Neuromodulator im Gehirn tätig und an der Regulation der Entwicklung des serotonergen Systems und anderer Neurotransmittersysteme im ZNS beteiligt. Viele Effekte von 5-HT auf die Entwicklung und Funktion des serotonergen Systems werden über 5-HT_{1A} Rezeptoren vermittelt.

Darüber hinaus gibt es viele Hinweise über die Interaktion zwischen dem serotonergen und den catecholaminergen Systemen. Der 5-HT_{1A} Rezeptor spielt bei der Interaktion und der Regulation der Aktivität dieser Systeme eine bedeutende Rolle.

Ziel dieser Studie war es, die Rolle des 5-HT_{1A} Rezeptors in der Entwicklung und Funktion des serotonergen Systems und der catecholaminergen Systeme im ZNS der Maus zu untersuchen. Diese Studie wurde parallel an KO, WT und ÜE Mäusen während der Entwicklungsperioden von E12,5 bis P15,5 durchgeführt. Im Detail standen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen im Mittelpunkt:

1. Welchen Einfluss haben transgene Veränderungen des 5-HT_{1A} Rezeptors auf die Entwicklung und Funktion des serotonergen Systems im Gehirn der Maus?
2. Welchen Einfluss haben transgene Veränderungen des 5-HT_{1A} Rezeptors auf die Entwicklung und Funktion der catecholaminergen Systeme im Gehirn der Maus?
3. Beeinflussen transgene Veränderungen des 5-HT_{1A} Rezeptors die Expression von S100 β Protein?
4. Ist der 5-HT_{1A} Rezeptor an der Myelinisierung und Synaptogenese im Gehirn beteiligt?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

In dieser Studie wurde mit NMRI WT Mäusen, 5-HT_{1A} Rezeptor ÜE (Linie 34) und KO Mäusen gearbeitet, die unter Standard-Laborbedingungen bei einer Raumtemperatur (RT) von etwa 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40-50% in Käfigen untergebracht wurden. Die Betreuung der Mäuse erfolgte im Tierstall des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Charité zu Berlin, wobei die Zucht und alle weiteren Arbeiten mit den Mäusen unter entsprechend geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt wurden. Als Nahrung erhielten die Mäuse Standard-Futter und Wasser *ad libitum*.

Die WT und ÜE transgenen Mäuse hatten den gleichen NMRI genetischen Hintergrund und wurden durch homologe Rekombination hergestellt. Die KO Mäuse mit 129 / Sv genetischem Hintergrund wurden von dem Zentrum für Neurobiologie und Verhalten an der *Columbia University in New York* zur Verfügung gestellt und dann mit den NMRI Mäusen über mehrere Generationen durch homologe Rekombination verpaart. Somit hatten die unter diesen Bedingungen erzeugten KO Mäuse einen ähnlich genetischen Hintergrund wie die WT und ÜE transgenen Mäuse. In der vorliegenden Studie wurden KO, WT und ÜE Mäuse von verschiedenen embryonalen Entwicklungsperioden (E12,5; E14,5; E16,5; E18,5) verwendet. Der Tag der Befruchtung wurde als E 0 bezeichnet. Postnatal erfolgte die Untersuchung zum Zeitpunkt P1,5 und P15,5.

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Herkunft
Äther	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Äthylenglykol	Sigma, St. Louis, USA
Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumnickelsulfat	Sigma, St. Louis, USA
Aprotinin	Sigma, St. Louis, USA
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma, St. Louis, USA
BCA (Natrium Bicinchoninsäure-4,4-di-carboxy-2,2-bichinolin)	Sigma, St. Louis, USA

Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
BSA (Rinderserum Albumin)	Sigma, St. Louis, USA
DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)	Sigma, St. Louis, USA
DHBA (3,4-Dihydroxybenzylamin Hydrobromid)	Sigma, St. Louis, USA
1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
DA (Dopamin,3,4-Dihydroxyphenäthylamin)	Sigma, St. Louis, USA
DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylethylsäure)	Sigma, St. Louis, USA
dNTPs set (100 mM)	Qbiogene, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, St. Louis, USA
ECL (Enhanced Chemiluminescence)	Perbio, USA
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Entwickler	Kodak, USA
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
Fixierer	Kodak, USA
Gelatin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd	Fulka, Neu-Ulm, Deutschland
Glycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Heparin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Hepes(N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure)	Sigma, St. Louis, USA
Hexan	Merck, Darmstadt, Deutschland
[³ H]8-OH-DPAT((±)-8-Hydroxy-2-(di- <i>n</i> -propylamino)tetralin)	Amersham.Bioscience,Freiburg, Deutschland
5-HIAA (5-Hydroxyindolessigsäure)	Sigma, St. Louis, USA

30% H_2O_2 (Wasserstoffperoxid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
5-HT (5-Hydroxytryptamin)	Sigma, St. Louis, USA
Imidazol	Sigma, St. Louis, USA
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid)	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe
Leupeptin	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Longasteril 70	Fresenius, Bad Homburg,
Magnesiumchloride	Eppendorf®, Hamburg, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na-Azid (Natriumazid)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumborhydrid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhypochloritlösung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na_2 -Tartrat (di-Natrium-Tartrat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NGS (Normales Ziegen Serum)	Biotech
NHS (Normales Pferdeserum)	Biochrom KG, Berlin
1-Octansulfonsäure Natriumsalz Monohydrat	Fulka, Switzerland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pargylin	Sigma, St. Louis, USA
PCA (Perchlorsäure)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin A	Roche
Phenylhydrazin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pikrinsäure	Sigma, St. Louis, USA

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau-S	Sigma, St. Louis, USA
Primer 1A 3	Tib Molbiol, Berlin, Deutschland
Primer 1A 5	Tib Molbiol, Berlin, Deutschland
Primer POS F	Tib Molbiol, Berlin, Deutschland
Primer POS R	Tib Molbiol, Berlin, Deutschland
Proteinase K	Invisorb®Spin Tissue Mini Kit, Invitek, Berlin, Deutschland
Rotiphorese Gel A, Acrylamid (30%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel B, Bisacrylamid (2%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rompun® (2%)	Bayer, Leverkusen
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS-PAGE Standards, Broad Range	Bio-RAD, Hercules, CA, USA
Skim Milk	Decton Dickinson, USA
Taq polymerase	Eppendorf
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylen-Diamin)	CarlRoth, Karlsruhe, Deutschland
TCA (Trichloressigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thiomersal	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween-20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA
Xylol	J,T,Baker, Deventer, Niederland

3.3 Verwendete Antikörper

3.3.1 Primärantikörper

Antikörper	Eigenschaft	Herkunft
Anti- 5-HT	polyklonal, Kaninchen	Sigma, St,Louis, USA
Anti-Myelinbasisprotein (MBP)	monoklonal, Maus	Sigma, St,Louis, USA
Anti- S100β	monoklonal, Maus	Sigma, St,Louis, USA
Anti- SNAP25 (C171.2)	monoklonal, Maus	Sternberger Monoclonals (Baltimore, MD, USA)
Anti- Synaptobrevin (Syb)	monoklonal, Maus	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland
Anti- Synaptophysin (Syp)	monoklonal, Maus	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland
Anti-Synaptotagmin (Syt,C141.1)	monoklonal, Maus	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland
Anti-TH	polyklonal, Kaninchen	Chemicon, Temecula,CA
Anti-TPH	monoklonal, Maus	Sigma, St,Louis, USA

3.3.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
biotinyliertes anti-Kaninchen IgG (Ziege)	1:2000	Vector laboratories, Burlingame,USA
biotinyliertes anti-Maus IgG (Pferd)	1:2000	Vector laboratories, Burlingame,USA
Peroxidase-gekoppeltes anti Kaninchen IgG (Ziege)	1:1000	Vector laboratories, Burlingame,USA
Peroxidase-gekoppeltes anti Maus IgG (Pferd)	1:500 / 1000	Vector laboratories, Burlingame,USA

3.4 Geräte und Materialien

Geräte/Materialien	Herkunft
CBM-10A Communications Bus Module	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Digitale Electrochemische Amperometrische Detektion (DECADE)	Antec Leyden BV, Niederland
Dynatech MR 5000 Elisa Reader	Dynatech ,Ashford, United Kingdom
Homogenisierer	Heidolph RZR 2021, Deutschland
Hybond™-C, Nitrocellulose membrane, 0,45 Micron	Amersham Life Science, Buckinghamshire, England
Hyperfilm CM	Amersham Life Science, Buckinghamshire, England
Kryostat, 2800 Frigocut	Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland
Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf®, Hamburg, Deutschland
LC-0AD Liquid Chromatograph	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Mikrofuge B	Beckman, USA
Lichtmikroskop	Leica DML, Wetzlar, Deutschland
Mini-Protean® 3 Electrophoresis Cell	Bio-RAD, Hercules, CA, USA
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
PCR-Thermocycler Omn-E	Hybaid, USA
PH-Meter CG 840	Schott, Deutschland
Photometer UV – 1202	Shimadzu, Japan
Power / PAC 200	Bio-RAD, Hercules, CA, USA
Scientific Imaging Film	Kodak , USA
Schüttler 3005	G.F.L.®, Burgwedel, Deutschland
Sonicator	Baudelin <i>electronic</i> , Berlin, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf®, Hamburg, Deutschland

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-RAD, Hercules, CA, USA
VT-03 Electrochemical Flowcell	Antec Leyden BV, The Netherlands
96-Loch Mikrotiter Platte	Falcon, USA
3-MM Whatman Filterpapier	Bio-RAD, Hercules, CA, USA

3.5 Methoden

3.5.1 Genotypisierung mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

3.5.1.1 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Bindungspuffer T	Invisorb®Spin Tissue Mini Kit, Invitek, Berlin
Elutionspuffer D	Invisorb®Spin Tissue Mini Kit, Invitek, Berlin
Lysierungspuffer G	Invisorb®Spin Tissue Mini Kit, Invitek, Berlin
Taq Reaktionspuffer mit Mg^{2+} (10x)	500 mM KCl ; 100 mM Tris-HCl, pH 8,3 ; 15 mM $MgCl_2$
TAE	40 mM Tris-Acetat ; 1 mM EDTA pH 8,0
Waschpuffer	Invisorb®Spin Tissue Mini Kit, Invitek, Berlin

3.5.1.2 DNA Extraction aus dem Mausschwanz

Genomische DNA aus dem Mausschwanz wurde mittels Invisorb®Spin Tissue Mini Kit (Invitek, Deutschland) isoliert. Ein 0,5 cm Schwanzabschnitt wurde präpariert und 400 µl Lysierungspuffer G (3.5.1.1) und 40 µl Proteinase K zugegeben und gemischt. Die Mischung wurde dann im Eppendorf Thermomixer (Hamburg, Deutschland) bei 52°C inkubiert, bis sich der Schwanz vollständig aufgelöst hatte. Die Lösung wurde bei RT für 2 min bei 12.000 U / min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und mit 200 µl Bindungspuffer T (3.5.1.1) gemischt und am Vortex für 10 sec geschüttelt. Die Suspension wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß mit einer Spinsäule überführt und für 1 min inkubiert und dann bei 12.000 U / min für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und

die Spinsäule wurde mit Waschpuffer gewaschen und wieder bei 12.000 U / min für 2 min zentrifugiert.

Nach der letzten Zentrifugation wurde die Spinsäule in ein neues Eppendorfgefäß gestellt. 200 µl erwärmter (bei 37 °C) Elutionspuffer D (3.5.1.1) wurde zugegeben und bei 10.000 U / min für 2 min zentrifugiert. Die gelöste DNA wurde für die Quantifizierung und PCR eingesetzt.

3.5.1.3 Primer

Die isolierte DNA vom Schwanz der KO, WT und ÜE Mäuse wurde getrennt mit spezifischen Primer Kombinationen (Tib Molbiol, Berlin) wie in folgender Tabelle dargestellt amplifiziert:

	Primer	Sequenzen
WT+KO	1A5	CAG TCT CTA GAT CCC CTC CCT T
	1A3	AGCAGCAGCGGAATATAGAAAG
WT+ÜE	POS F	AAT CAA GTG ACA AAG ATG TC
	POS R	G TA GAG CAC TAA TAC ACA TT

3.5.1.4 Vorbereitung für PCR-Ansätze

Zur Vervielfältigung der entsprechenden DNA Sequenzen wurden folgende Ansätze verwendet:

	WT+KO	WT+ÜE
H ₂ O	38 µl	38 µl
10x Taq Reaction Puffer	5 µl	5 µl
10 mM dNTP	1 µl	1 µl
1.5 mM MgCl ₂	2.5 µl	2.5 µl
Taq DAN Polymerase	0.5 µl	0.5 µl
Primer		
POS F		0.5 µl
POS R		0.5 µl
1A5	0.5 µl	
1A3	0.5 µl	

Bei jedem Experiment wurden negative Kontrolle (H₂O) und positive Kontrolle (schon bekannte DNA positive Probe) gleichzeitig durchgeführt.

3.5.1.5 Durchführung der PCR

2 µl DNA Extraktionsprobe aus dem Mausschwanz wurde mit 48µl unter 3.5.1.4 beschriebenen PCR-Ansatz gemischt. Ein PCR-Zyklus wurde wie folgt durchgeführt:

Reaktionsschritt	WT+KO	WT+ÜE
Initiale Denaturierung	90 sec bei 94 °C	90 sec bei 94 °C
Denaturierung	30 sec bei 94 °C	30 sec bei 94 °C
Annealing	45 sec bei 60 °C	45 sec bei 52 °C
Extension	3 min bei 72 °C	45 sec bei 72 °C
Zahl der Zyklen	30	27
Finale Extension	10 sec bei 72 °C	10 sec bei 72 °C

3.5.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurde DNA Fragment zur Analyse und Isolierung aufgetrennt. Die Größe der DNA-Moleküle in Basenpaaren (bp) wurde im Vergleich mit einem 1 kb DAN Ladder (MBI Fermentas) abgeschätzt. 10 µl / Geltasche DNA-Standard und PCR vervielfältigte DNA Produkte wurden auf 1% Agarose-Gel im TAE Puffer (1x) aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 80 V etwa 20 min aufgetrennt.

3.5.2 Autoradiographie

3.5.2.1 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Inkubationspuffer	25 ml 1 M Tris; 1,015 g MgCl ₂ ; 1 ml 0,5 M EDTA; pH 7,7
Spezifische Bindungslösung	35 ml Inkubationspuffer; 3,5 µl Pargylin; 8,75 µl [³ H]-8OH-DPAT (1mCi / ml)

3.5.2.2 Durchführung der Autoradiographie

P1,5 und P15,5 KO, WT und ÜE Mäuse wurden dekapitiert, die Gehirne sofort entnommen, in pulverisiertem Trockeneis eingefroren und bis zur Bearbeitung bei -80°C gelagert. Die Gehirne wurden seriell koronar ($20\text{ }\mu\text{m}$) mit dem Kryostat (Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland) bei -15°C geschnitten und die Schnitte direkt auf SuperFrost®Plus Objektträger (Menzel-Glaser, Deutschland) aufgezogen und bei -80°C aufbewahrt.

Die Schnitte wurden in Inkubationspuffer mit 0,1% Pargylin bei RT für 10 min vorinkubiert und dann in spezifischer Bindungslösung (3.5.2.1) bei RT für 60 min inkubiert. Die Schnitte wurden zweimal 5 min mit Inkubationspuffer mit 0,1% Pargylin bei 4°C gewaschen, dann mit vorgekühltem destilliertem Wasser (4°C) einmal 1 min gespült und an der Luft 24 h getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte auf Amersham Hyperfilm CM bei RT für 3 Wochen exponiert.

3.5.3 Immunhistochemie

3.5.3.1 Verwendete Lösungen und Puffer

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
ABC- Komplex	10 ml 2 % PBS-A; 10 μl Elite A; 10 μl Elite B
Blocklösung	9,7 ml 10% NGS in PBS; 0,3 ml 10% Triton X-100 in H_2O ; 5 μl Phenylhydrazin
Gefrierschutzlösung	6,9 g 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 150 g Ethylenglycol; 150 g Saccharose; pH 7,4
Fixierungslösung	4% (w / v) Paraformaldehyd; 0,05% (v / v) Glutaraldehyd; 0,1 M PBS (pH 6,81)
Inkubationslösung	500 μl Vorinkubationslösung; 50 μl 3% Ammonium-nickelsulfat; 25 μl 0,3% H_2O_2
Phosphat-gepuffete physiologische Kochsalzlösung (PBS) 1 M	80 g Natriumchlorid; 2 g Kaliumchlorid; 14 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2 g Natriumhydroxid; 1000 ml H_2O ; pH 6,81

Nachspülungslösung	27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 100 g Saccharose; 2000 ml H_2O ; pH 7,38
PGPIC-Fixierungslösung	80 g Paraformaldehyd; 300 μl 10 N Natriumhydroxid; 27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 4 ml 25% Glutaraldehyd; 333 ml Pikrinsäure; 2000 ml H_2O ; pH 7,38
Vorinkubationslösung	100 μl 1 M Imidazol; 100 μl 5% DAB; 500 μl 1M Tris; 9,5 ml H_2O
Primäre Antikörperlösung	10 ml 10% NGS; 0,3 ml 10% Triton X-100 in H_2O ; 100 μl 10% Natriumazid; 100 μl 1% Thiomersal
Sekundäre Antikörperlösung	10 ml 2% PBS-A; 0,3 ml 10% Triton X-100 in H_2O ; 100 μl 10% Natriumazid

3.5.3.2 Präparation der Gehirne

3.5.3.2.1 Gehirne von embryonalen und P1,5 Mäusen

Die KO, WT und ÜE trächtigen Mäuse wurden jeweils am E12,5, E14,5, E16,5 oder E18,5 dekapitiert. Die Embryonen wurden aus dem Uterus entfernt und in eine eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung gelegt. Die Gehirne der Embryonen wurden sofort entnommen und in der Fixierungslösung (3.5.3.1) bei 4°C für 4-6 h fixiert.

Die jeweiligen P1,5 KO, WT und ÜE Mäuse wurden dekapitiert. Die Gehirne wurden sofort aus den auf Eis gelagerten Schädeln entnommen und in Fixierungslösung (3.5.3.1) bei 4°C für 4-6 h fixiert.

Anschließend wurden die Gehirne von E12,5 bis P1,5 auf 2% Agarose-Gel Blöckchen und Korkplättchen aufgebracht und in Stickstoff gekühltem Hexan (– 60°C) gefroren und bei –80°C aufbewahrt. Die Gehirne wurden seriell koronar (20 μm) mit dem Kryostat bei -25°C geschnitten und die Schnitte direkt auf SuperFrost®Plus Objektträger aufgezogen und etwa 30 min an der Luft getrocknet und anschließend bei –20°C aufbewahrt.

3.5.3.2.2 Gehirne von P15,5 Mäusen

Die jeweiligen P15,5 KO, WT und ÜE Mäuse wurden mit einer intraperitonealen (ip) Injektion von Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], 0,1 mg / g Körpergewicht) und 2 % Xylazinhydrochlorid (Rompun[®], 0,013 mg / g Körpergewicht) narkotisiert und mit 2500 IU Heparin ip behandelt. Der Brustkorb wurde eröffnet und das Herz freipräpariert. Der Blutkreislauf wurde am linken Ventrikel geöffnet und über einen Polyethylenschlauch mit einem Perfusionssystem verbunden. Die Perfusion wurde wie in folgender Tabelle dargestellt durchgeführt.

Perfusionslösung	Perfussionsdruck	Zeitdauer
Vorspüllösung (Longasteril 70)	50 Torr	10 sec
PGPIG (3.5.3.1)	100 Torr	5 min
	20 Torr	5 min
Nachspüllösung (3.5.3.1)	70 Torr	5 min

Nach der Perfusion wurden die Gehirne entnommen und in der Nachspüllösung mit 1% PFA bei 4°C für 24 h aufbewahrt. Im Anschluss daran wurden die Gehirne zum Schutz vor Gefrierartefakten in einer 30% Saccharose in PBS (0,1M, pH 6,81) bei 4°C für 24 h eingelegt. Anschließend wurden die Gehirne auf 2% Agarose-Gel Blöckchen und Korkplättchen aufgebracht und in Stickstoff gekühltem Hexan (– 60°C) gefroren und bei –80°C aufbewahrt.

Die Gehirne wurden seriell koronar mit dem Kryostat bei – 25°C (25 µm) geschnitten und die Schnitte wurden in Gefrierschutzlösung (3.5.3.1) bei – 20°C aufbewahrt.

3.5.3.3 DAB – Immunfärbung

Die Schnitte von Embryonen und P1,5 Mäusen wurden in eine feuchte Inkubationskammer gelegt. Die Schnitte von P15,5 Mäusen, die in der Gefrierschutzlösung aufbewahrt waren, wurden zuerst viermal für 5 min in 0,1M PBS gespült. Zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden alle Schnitte von E12,5 bis P15,5 30 min bei RT mit 0,05% Phenylhydrazin in 0,1M PBS mit 10% NGS oder NHS und 0,3% Triton-X 100 behandelt. Anschließend wurden die Schnitte in eine entsprechend verdünnte Lösung des Primärantikörpers (Tab. 1) überführt und bei 4°C 36 h inkubiert.

Tab.1 Verdünnungen der Primärantikörper bei den verschiedenen Entwicklungsstadien

	P15,5	P1,5 - E12,5
Anti-5-HT	1: 10000	1: 5000
Anti-MBP	1: 2000	1: 500
Anti-TH	1: 2000	1: 500
Anti-S100 β	1: 2000	1: 500

Nach viermaligem Waschen für insgesamt 1 h in 0,1 M PBS und Vorinkubation für 1 h bei RT in der PBS-A Lösung (2% BSA in 0,1 M PBS) wurden die Schnitte mit der entsprechenden Lösung des Sekundärantikörpers (1:2000) 24 h bei 4°C beschichtet.

Es folgten wiederum Spülung und Vorinkubation, bevor die Schnitte mit dem unter 3.5.3.1 beschriebenen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-Komplex) für 4 h bei RT inkubiert wurden.

Nach vier fünfminütigen Auswaschen des ABC-Komplexes in 0,1M PBS wurden die Schnitte 15 min bei RT mit der Vorinkubationslösung (0,05% DAB und 10 mM Imidazol) vorinkubiert, anschließend wurde die gebundene Peroxidase durch Zugabe von 0,3% Ammoniumnickelsulfat und 0,015% H₂O₂ angefärbt. Nach 3-5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1M PBS gestoppt und nach zwei fünfminütigen Auswaschen in 0,1M PBS wurden die Schnitte von P15,5 Mäusen auf die Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen und etwa 30 min an der Luft getrocknet, anschließend wurden alle Schnitten (E12,5-P15,5) in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 96%, 2x 100%) für insgesamt 10 min entwässert, dann in Xylol gebracht und danach in Entellan eingedeckt und unter dem DML Lichtmikroskop (Fa. Leica) analysiert und photographiert. Bei jedem Experiment wurden negative Kontrollen (ohne Primärantikörper) gleichzeitig durchgeführt.

3.5.4 Western Blot

3.5.4.1 Verwendete Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer

Zusammensetzung

Antikörperlösung	1,5 g BSA (1,5 %); 100 ml 1×TS-Puffer
BCA-Lösung A	25,8 mM BCA-Dinatrium; 160 mM Na ₂ CO ₃ 7 mM Na ₂ -Tartrat; 100 mM NaOH; 113 mM NaHCO ₃
BCA-Lösung B	160 mM CuSO ₄ ·5H ₂ O
Elektrophorese Puffer (10 ×)	30 g Tris; 144 g Glycin; 10 g SDS; 1000 ml H ₂ O
Homogenisierungspuffer	320 mM Saccharose; 4 mM Hepes; pH 7,5 (aufbewahrt bei –20°C). Vor Gebrauch frisch dazugeben: Leupeptin (1 µg / ml in H ₂ O), Pepstatin (1 µg / ml in H ₂ O), Aprotinin (2 µg / ml in H ₂ O), und PMSF (0,5 mM in Ethanol)
Magermilchpuffer	25 g Skim Milk (5%); 500 ml 1×TS-Puffer; 500 µl Tween-20
0,2% Ponceau-S Lösung	1 g Ponceau-S; 3 % TCA; 500 ml H ₂ O
3 × Probenpuffer	4,5 g SDS; 12,48 ml Sammelgel-Puffer (4x); 1,5 ml 0,1 M EDTA; 15g Saccharose; 800 µl Bromphenolblau (4mg / ml); 45 ml H ₂ O; 5 ml 1,5 M DTT; pH 6,8-7,0
Sammelgel-Puffer (4x)	500 mM Tris; 0,4 % SDS; pH 6,8
Semi-Dry-Blotpuffer	2,9 g Glycin; 5,8 g Tris; 0,379 g SDS; 800 ml H ₂ O; 200 ml Methanol
10xTS-Puffer	24,23 g Tris; 87,66 g NaCl; 1000 ml H ₂ O; pH 7,5
Trenngel-Puffer (4x)	1,5 M Tris; 0,4 % SDS; pH 8,8

3.5.4.2 Aufarbeitung der Gehirne

Die trächtigen KO, WT und ÜE Mäuse wurden dekapitiert und die Embryonen in verschiedenen Entwicklungsperioden wurden aus dem Uterus entfernt und in eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung gelegt. Die Gehirne der Embryonen wurden sofort auf Eis herauspräpariert und umgehend in 0,5 ml (3 gepoolte Gehirne bei E12,5 und E14,5), 1 ml (bei E16,5) oder 1,5 ml (bei E18,5) eisgekühlten Homogenisierungspuffer (3.5.4.1) homogenisiert.

Die P1,5 KO, WT und ÜE Mäuse wurden dekapitiert und die Gehirne sofort auf Eis entnommen und in 1,5 ml eisgekühltem Homogenisierungspuffer (3.5.4.1) homogenisiert.

Die P15,5 KO, WT und ÜE Mäuse wurden mit Äther tief anästhesiert und dekapitiert. Nachdem die Gehirne auf Eis herauspräpariert wurden, wurden sie sofort in 2 ml eisgekühltem Homogenisierungspuffer (3.5.4.1) homogenisiert.

Alle Homogenate wurden mit einer Kältezentrifuge 5402 bei 5500 U / min für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Ein Teil des Überstands wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt und der andere Teil wurde mit 3 x Probenpuffer im Verhältnis 2 : 1 gemischt, bei 95°C für 5 min erhitzt und aliquotiert bei -20° C aufbewahrt.

3.5.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Über Verdünnungsreihen wurde eine Standardkurve von 50 bis 400 µg / ml BSA hergestellt. Die Proben wurden üblicherweise mit 0,4% Triton-X 100 in Verdünnungsreihen angesetzt und in Duplikaten in die Löcher einer 96-Loch Mikrotiter Platte (20 µl / Loch) pipettiert. Dazu wurden pro Loch 200 µl der BCA Reaktionslösung zugegeben (eine Mischung aus BCA Lösung A und B im Verhältnis von 50:1, v / v). Die Mikrotiter Platte wurde dann für 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Platte für 10 min zum Abkühlen stehen lassen, bevor die Extinktion der Proben bei 550 nm in einem ELISA-Reader (Dynatech MR 5000, UK) gemessen wurde. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden anhand der Standardkurve bestimmt.

3.5.4.4 Western Blot und Immundetektion

3.5.4.4.1 SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS – PAGE)

3.5.4.4.1.1 Herstellung des Gels

Das Gel wurde wie folgt hergestellt.

	Trenngel (1 x 10%)	Sammelgel (1 x 3,75 %)
Trenngel-Puffer (pH 8,8)	1,5 ml	
Sammelgel-Puffer (pH 6,8)		500 µl
Acrylamid Stammlösung	2,0 ml	250 µl
Bisacrylamid Stammlösung	0,8 ml	100 µl
H ₂ O	1,7 ml	1150 µl
TEMED	8,0 µl	2,6 µl
10%APS	60 µl	20 µl

Mittels SDS–PAGE unter Anwendung des diskontinuierlichen Puffersystems nach dem Prinzip von Lämmli (1970) können Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels wurde je nach gewünschtem Auftrennungsbereich variiert. Ein 10 %iges Trenngel erreicht eine gute Auftrennung von Proteinen mit einer Molmasse bis zu 10kDa.

3.5.4.4.1.2 Auftragung der Proben und Standards

Vor dem Aufbringen auf das Gel wurden die zu analysierenden Proteinproben für 5 min bei 95°C zur Denaturierung erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Proben jeweils nach den gewünschten Proteinkonzentrationen (z.B. 20-30 µg / Tasche) in die Tasche des SDS-Polyacrylamidgels aufgetragen. Zur Charakterisierung des Molekulargewichts der aufzutrennenden Proteine wurde bei jedem Lauf des Gels ein Standard im SDS-PAGE mitgeführt. Vom Standard wurde 10 µl / Tasche SDS-PAGE Standard von 6,5 bis 200 kDa verwendet, die 1:20 mit dem SDS reduzierten Probenpuffer (3.5.4.1) verdünnt und für 5 min bei 95°C erhitzt wurde.

3.5.4.4.1.3 Gelelektrophorese

Nach Beladung des Polyacrylamidgels wurden die Proben bei RT für etwa 30 min bei 80V aufgetrennt, bis die Front des Probenpuffers die Grenze des Trenngels erreicht hat. Anschließend wurde die Spannung auf 160 V umgestellt und das Gel für etwa 1 h bei RT weiterlaufen lassen, bis die Front des Probenpuffers den unteren Gelrand erreicht hat.

3.5.4.4.2 Western Blot

In der Transferapparatur (Mini-Protean®3 Electrophoresis Cell, Bio-RAD) wurde ein Sandwich aus folgenden Komponenten zusammengestellt.

Kathode Platte

vorgetränktes 3 MM Whatmann Filterpapier

vorgetränktes 3 MM Whatmann Filterpapier

SDS - Polyacrylamidgel

vorgetränkte NC - Membran

vorgetränktes 3 MM Whatmann Filterpapier

vorgetränktes 3 MM Whatmann Filterpapier

Anode Platte

Der Transfer erfolgte in der oben aufgebauten Transferapparatur für 25 min bei RT bei einer Stromstärke von 300 mA pro Gel im Semi-Dry Verfahren unter Verwendung von Semi Dry Puffer.

Um die Banden der Marker-Proteine sichtbar zu machen und die Integrität der übrigen Proteine zu testen, wurden die NC-Membranen nach erfolgreichem Transfer in 0,2% Ponceau-S Lösung für 2-3 min angefärbt und anschließend mit H₂O gewaschen und getrocknet. Zur Bestimmung verschiedener Proteine in einer Membran wurde die Membran mit dem Skalpell in horizontale oder vertikale Streifen geschnitten, wobei die Banden der Marker-Proteine als Anhaltspunkte für das ersichtliche Molekulargewicht der Proteine dienten.

3.5.4.4.3 Immundetektion

Die Membranen wurden jeweils getrennt von jeder Gruppe mit dem Antiserum inkubiert. Nach dem Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen mit 5% Magermilchpuffer in TBS / 0,1% Tween 20 (3.5.4.1) bei RT für 1 h wurden die Membranen mit dem in der Antikörperlösung (3.5.4.1) verdünnten Primärantikörper bei 4°C 24 h inkubiert.

Tab.2 Verdünnungen der Primärantikörper in der verschiedenen Entwicklungsstadien

	P15,5	P1,5 - E12,5
Anti-MBP (Maus)	1: 2000	1:1000
Anti-TH (Kaninchen)	1: 4000	1:1000-2000
Anti- SNAP25 (Maus)	1:1000	1:1000
Anti- Synaptotagmin (Maus)	1:1000	1:1000
Anti- Synaptobrevin (Maus)	1:10 000	1:10 000
Anti- Synaptophysin (Maus)	1:10 000	1:5000

Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen viermal für 15 min mit 5% Magermilchpuffer gewaschen. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte für 1 h bei RT mit Peroxidase-gekoppelten Pferd-anti-Maus bzw. Schaf-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (beide Verdünnungen von 1:1000 in Antikörperlösung, 3.5.4.1). Nach zweimaligem 15 min Waschen der Membranen mit 5% Magermilchpuffer wurden die Membranen nur mit TBS zweimal für 15 min gewaschen. Alle Inkubations-und Wasch-Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt.

Zur Detektion der Peroxidase Aktivität wurden die Membranen für 1 min in Chemolumineszenz-Lösung inkubiert und in einer Filmkassette zusammen mit einem Scientific Imaging Film (Kodak, USA) für 1-30 min exponiert. Die Exponierungszeit hing von der Stärke des Bandsignals ab.

3.5.5 Quantitative Analyse von Monoamin-Neurotransmittern und deren Metaboliten mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion (HPLC-ED)

Die Erfassung des Gehalts an endogenem 5-HT und dessen Metabolit 5-HIAA, DA und dessen Metabolit DOPAC, und NA erfolgte mittels HPLC-ED und wurde an KO, WT and ÜE Mäusen in verschiedenen Entwicklungsperioden (E12,5; E14,5; E16,5; E18,5; P1,5; P15,5) durchgeführt. Bei jeder Gruppe wurden jeweilig mindestens sechs Mäuse benutzt.

3.5.5.1 Durchführung der HPLC-ED

3.5.5.1.1 Die Bedingungen der Bestimmung von 5-HT und 5-HIAA

Mobile Phase	0.1 M Natriumazetat 1 mM EDTA 5 % Methanol pH 4.5
Stationäre Phase	Spherisorb ODS - 2.5µm, 250mm x 4.6mm
Injektionsvolumen	20 µl
Säulentemperatur	35°C
Flussrate	1.0 ml / min
elektrochemischer Detektor	Arbeitselektrode: glassy carbon Referenzelektrode: 3 M KCl Potential: +0,65 V

3.5.5.1.2 Die Bedingungen der Bestimmung von DA und NA

Mobile Phase	0.1 M Natriumphosphat 0,1 mM EDTA 0,5 mM Octansulfonsäure 5 % Methanol pH 4,75 - 4,8
Stationäre Phase	Merck Lichrospher 100 RP-18, 5µm, 125mm x 4,0mm
Injektionsvolumen	20 µl
Säulentemperatur	35 °C
Flussrate	0,8 ml / min
elektrochemischer Detektor	Arbeitselektrode: glassy carbon Referenzelektrode: 3 M KCl Potential: +0,65 V

3.5.5.2 Präparation und Aufarbeitung der Gehirne

Die trächtigen KO, WT und ÜE Mäuse wurden jeweils am E12,5, E14,5, E16,5 oder E18,5 dekapitiert und die Embryonen wurden aus dem Uterus entfernt und in eine eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung gelegt. Die Gehirne der Embryonen wurden sofort entnommen und auf Trockeneis eingefroren und bis zur Bestimmung bei -80°C aufbewahrt. Die P1,5 und P15,5 KO, WT und ÜE Mäuse wurden dekapitiert und die Gehirne sofort entnommen, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Jedes P15,5 Gehirn wurde auf einer Kühlplatte (-15°C) in fünf verschiedene Subregionen (Bulbus olfactorius, Frontalcortex, Striatum, Hippocampus, und Hypothalamus) präpariert. Jede Probe wurde sofort in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gewogen und bei - 80°C aufbewahrt.

3.5.5.2.1 Bestimmung von 5-HT und 5-HIAA

Die Gewebe wurden mit entsprechender Menge (je nach der Verdünnung) von 0,1 M Perchlorsäure (PCA) versetzt und mit einem Sonicator homogenisiert und dann bei 13 000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 20 µl direkt ins HPLC-ED System injiziert (Sperk, 1982)

3.5.5.2.2 Bestimmung von DA und NA

Die Gewebe wurden mit entsprechender Menge (je nach der Verdünnung) von 0,1 M PCA versetzt und mit einem Sonicator homogenisiert und bei 13 000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert. 300 µl Überstand wurden mit 30 µl 10^{-7} M internen Standard (DHBA) und 1 ml 1% Al_2O_3 in Tris / HCl (pH 8,6) versetzt und bei 4°C für 10 min geschüttelt, anschließend in einer Eppendorffzentrifuge (90° fixer Winkel) für 90 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1 ml H_2O gewaschen und danach noch einmal 90 sec zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 300 µl 0,1 M PCA versetzt und bei 4 °C für 10 min geschüttelt und danach 90 sec zentrifugiert. Von diesem Überstand wurden 20 µl direkt ins HPLC-ED System injiziert (Sperk et al. 1981).

3.5.6 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden als Mittelwerte und Standardfehler (MW+SEM) angegeben. Zur statistischen Auswertung bei Vergleich mehrerer Gruppen wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes von SigmaStat ein one-way ANOVA (one-way analysis of variance, die eine Aussage darüber trifft, ob sich mehrere Gruppen signifikant voneinander unterscheiden) durchgeführt, gefolgt von dem Tukey's post hoc-Test. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ definiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Genotypisierung der KO, WT und ÜE Mäuse

In dieser Studie wurden die KO, WT und ÜE Mäuse durch homologe Rekombination erzeugt. Deshalb war es nicht nötig, jede Maus zu genotypisieren. Zur Kontrolle wurden die oben genannten Mäuse-Linien nur periodisch mittels PCR typisiert.

Bei den PCR Produkten, die mit Primer 1A 5 and 1A 3 amplifiziert wurden, entstand eine Bande von 759 bp für WT Allel, es gab keine Bande für KO Allel (Abb. 7A). Das andere mit Primer POS F und POS R amplifizierte PCR Produkt, wies eine Bande von 400 bp für ÜE Zielallel auf. Bei WT Mäusen trat keine Bande auf (Abb. 7B).

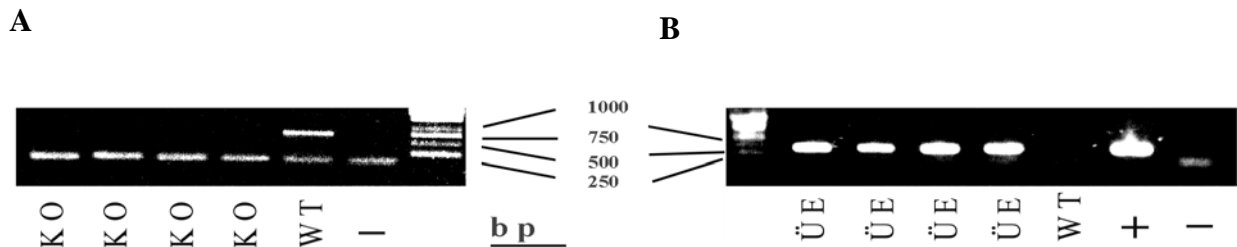


Abb. 7 Genotypisierung der KO, WT und ÜE Mäuse mittels PCR. Die Präparation der genomischen DNA erfolgte aus der Biopsie des Mausschwanzes. Zwei jeweilige Reaktionen wurden für jede genomische DNA Probe durchgeführt. Die benutzten Primer waren für die Reaktion von WT + KO und WT + ÜE unterschiedlich. **A:** PCR der WT und KO Mäuse. **B:** PCR der WT und ÜE Mäuse. „+“ : Positive Kontrolle; „-“: negative Kontrolle. Die Nummern zwischen beiden Bilder beziehen sich auf die Größe der Standard-DNA-Moleküle in bp.

4.2 Vergleich der Hirnentwicklung während der embryonalen und frühpostnatalen Periode anhand der Gewichtszunahme bei KO, WT und ÜE Mäusen

Die Gehirne der KO, WT und ÜE Mäuse von E12,5 bis P1,5 haben wir vor der Aufarbeitung für die HPLC - Messung gewogen. Es waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Mäuse-Linien zu erkennen (Abb. 8).

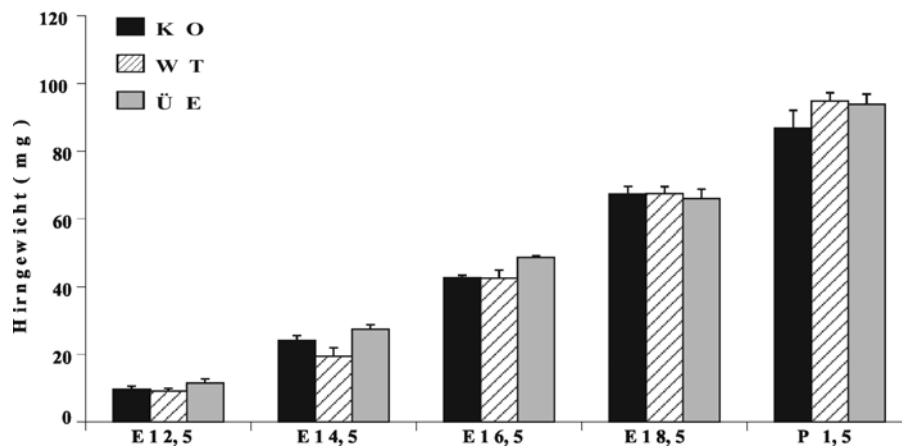


Abb. 8 Gesamthirngewichte (mg) von E12,5 - P1,5 Mäusen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben (n = 8-9). Statistische Auswertung wurde mittels one-way ANOVA mit dem Tukey's post hoc-Test durchgeführt.

4.3 Autoradiographischer Nachweis von 5-HT_{1A} Rezeptor

Um die Veränderung der Expression des 5-HT_{1A} Rezeptors nachzuweisen, wurde die Rezeptorautoradiographie mit dem 5-HT_{1A} Rezeptor Radioligand [³H]-8OH-DPAT, einem Agonist des 5-HT_{1A} Rezeptors, bei den verschiedenen Mäuse-Linien durchgeführt. Zum Zeitpunkt P1,5 waren die Bindungssignale in den Hirnschnitten der ÜE Mäuse bereits wesentlich stärker ausgeprägt als in denen der WT Mäuse (Abb. 9A). Hingegen wie aus der Abb. 9B hervorgeht, waren die Bindungssignale von [³H]-8OH-DPAT in den Hirnschnitten von P15,5 WT und ÜE Mäusen vergleichbar und zu diesem Zeitpunkt war bei WT Mäusen die typische Verteilung der Bindungsstellen von [³H]-8OH-DPAT im Gehirn mit intensiven Bindungssignalen im Septum, Hippocampus und in den Raphe Nuclei erkennbar und entsprach dem Verteilungsmuster bei adulten Mäusen (Heisler et al., 1998). Im Gegensatz dazu gab es keine spezifischen autoradiographischen Signale von [³H]-8OH-DPAT in den Hirnschnitten der P15,5 KO Mäuse (Abb. 9C). Die Ergebnisse der Autoradiographie wurden freundlicherweise von Frau Dr. Kusserow zur Verfügung gestellt.

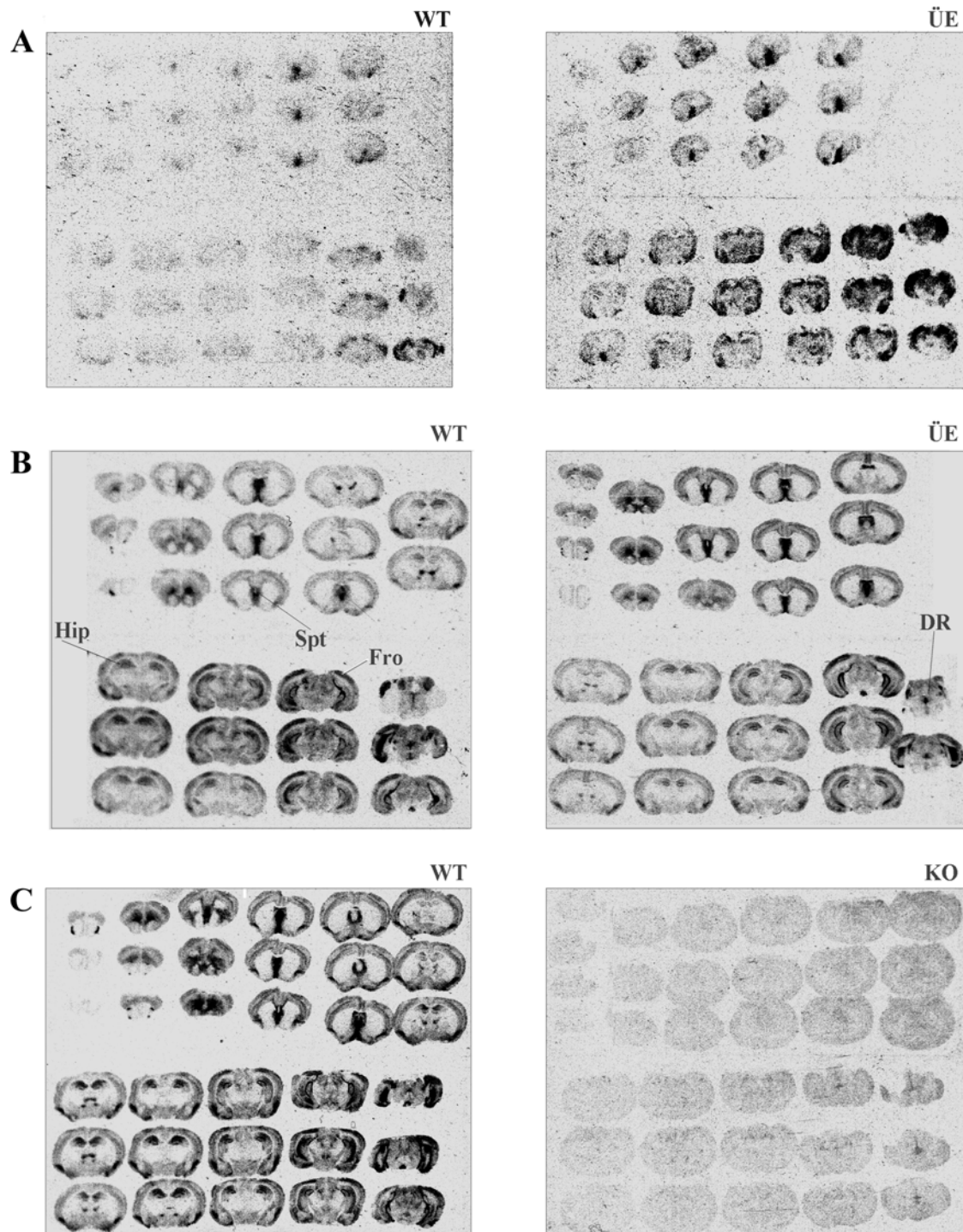


Abb. 9 Rezeptorautoradiographie mit [^3H]-8OH-DPAT, einem Agonist des 5-HT $_{1A}$ Rezeptors. **A:** Autoradiographie der Hirnschnitte von P1,5 WT und ÜE Mäusen. Die Bindungssignale bei ÜE Mäusen waren stärker als die bei WT Mäusen. **B:** Autoradiographie der Hirnschnitte von P15,5 WT und ÜE Mäusen. Es waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen WT und ÜE Mäusen erkennbar. **C:** Autoradiographie der Hirnschnitte von P15,5 WT und KO Mäusen. Keine Bindungssignale waren bei KO Mäusen nachweisbar.

4.4 Immunhistochemische Analyse bei KO, WT und ÜE Mäusen

Die Entwicklung und Verteilung des serotonergen Systems im Gehirn der KO, WT und ÜE Mäuse während der embryonalen (E12,5; E14,5; E16,5; E18,5) und postnatalen Perioden (P1,5 und P15) wurden mit einer immunhistochemischen Technik untersucht. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden eine Reihe von serotonergen wie auch anderen neuronalen Markern mit DAB-Immunfärbung an seriellen Hirngefrierschnitten (20-25µm) im gesamten Gehirn untersucht. Dadurch war es möglich, an aufeinanderfolgenden Hirnschnitten das Entwicklungsprofil der verschiedenen Proteine parallel zu erfassen. Wegen der bekannten Interaktionen zwischen dem serotonergen System und der Entwicklung catecholaminerger Systeme wurden neben der Untersuchung serotonerger Marker wie 5-HT, TPH auch ein catecholaminerger Marker wie TH eingesetzt. Da der 5-HT_{1A} Rezeptor möglicherweise an der Regulation des neurotrophen Faktors S100β beteiligt ist, wurde auch S-100β untersucht. Als weiterer morphologischer Parameter zur Beobachtung der Entwicklung und Reifung des ZNS wurde das Ausmaß der Myelinisierung mittels MBP und der Synaptogenese mittels der verschiedenen synaptischen Proteine untersucht.

4.4.1 Vergleich der Entwicklung der serotonergen Raphe Neurone in den drei Mäuse-Linien

Die Zellkörper serotonerger Neurone befinden sich hauptsächlich in den verschiedenen Regionen der Raphe (B1-B9). Bei der vergleichenden Untersuchung zwischen KO, WT und ÜE Mäusen wurde der Schwerpunkt auf die verschiedenen Raphe Regionen gelegt. In der Abb. 10 sind die Entwicklungen serotonerger Neurone der verschiedenen Raphe Regionen in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien dargestellt. Bei E12,5 Mäusen zeigten die serotonergen Neurone bei allen drei Mäuse-Linien eine vergleichbar starke Immunreaktivität. In der weiteren Entwicklung von E14,5 bis P1,5 waren keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Immunreaktivitäten serotonerger Neurone in den verschiedenen Raphe Nuclei wie Nucleus raphe dorsalis (DRN), Nucleus raphe medianus (MRN), Nucleus raphe paramedianus (PMR) und Nucleus raphe magnus (NMR) zwischen KO, WT und ÜE Mäusen zu erkennen.

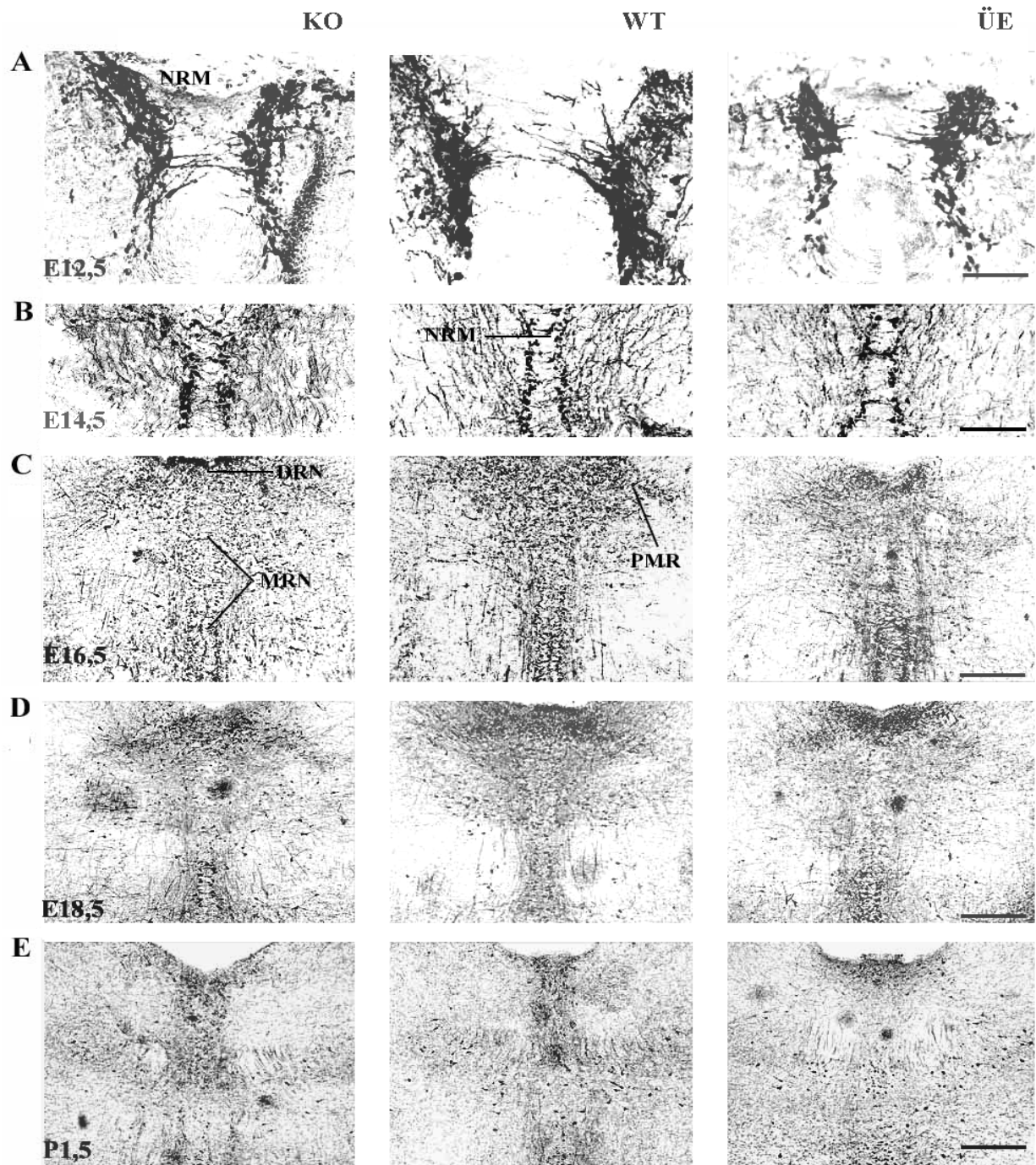


Abb. 10 Immunreaktivität der serotonergen Neurone in verschiedenen Raphe Nuclei bei KO, WT und ÜE Mäusen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (E12,5 - P1,5). Die Immunfärbungen der koronaren Hirnschnitte wurden mit einem polyklonalen (Kaninchen) Antikörper gegen 5-HT (1:5000) ausgeführt. In den verschiedenen serotonergen Raphe Nuclei sind stark gefärbte Neurone zu erkennen. **A:** E12,5; **B:** E14,5; **C:** E16,5; **D:** E18,5; **E:** P1,5. Die Maßstäbe entsprechen 50 µm in **A**; 100 µm in **B**; 200 µm in **C**, **D** und **E**.

4.4.2 Quantifizierung der serotonergen Neurone in der dorsalen Raphe bei P15,5 Mäusen

Die serotonergen Neurone in der dorsalen Raphe bei P15,5 Mäusen wurden mit polyklonalem Antikörper gegen 5-HT intensiv gefärbt. Die Zahl der serotonergen Neurone wurde in drei verschiedenen vergleichbaren Hirnschnitten von zwei Mäusen aus jeweiligen Mäuse-Linien (KO, WT und ÜE) gezählt. Die Immunreaktivität der serotonergen Neurone waren bei allen drei Mäuse-Linien zum Zeitpunkt P15,5 vergleichbar (Abb. 11A). Keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Zahl der serotonergen Neuronen waren zwischen den drei Mäuse-Linien zu erkennen ($p > 0,05$, Abb. 11B).

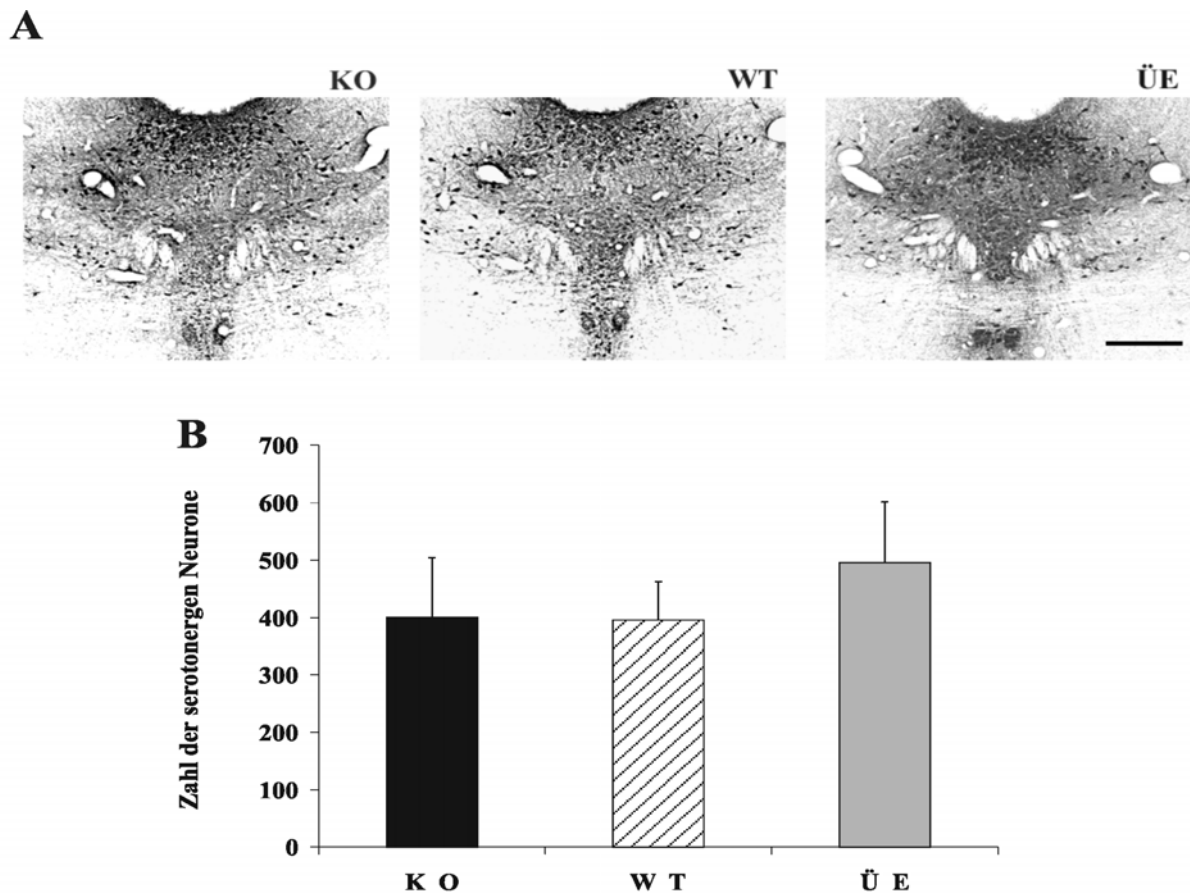


Abb. 11 Immunhistochemische Analyse der serotonergen Neurone bei P15,5 Mäusen in verschiedenen Mäuse-Linien. **A:** Die Immunfärbung der Hirnschnitte wurde mit einem polyklonalen (Kaninchen) Antikörper gegen 5-HT (1:10000) durchgeführt. Die Maßstäbe entsprechen 200 μm in **A**; **B:** Quantifizierung der serotonergen Neurone. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben ($n = 6$). Statistische Auswertung wurde mittels one-way ANOVA mit dem Tukey's post hoc-Test durchgeführt ($p > 0,05$).

4.4.3 Vergleich der Entwicklung der serotonergen Fasern in den Projektionsregionen bei den verschiedenen Mäuse-Linien

Die Axone der serotonergen Neurone in den rostralen Raphe Nuclei projizieren aufsteigend ins Vorderhirn und Mittelhirn. In diesen Projektionsgebieten verfolgten wir daher die Entwicklung und Verteilung serotonerger Fasern in den verschiedenen Entwicklungsstadien mit immunhistochemischer Methode bei KO, WT und ÜE Mäusen.

4.4.3.1 Verteilung und Dichte der serotonergen Fasern zum Zeitpunkt E12,5

Bei E12,5 Mäusen waren serotonerge Projektionen bei allen drei Mäuse-Linien schon nachweisbar. Aber die Dichte der immunreaktiven serotonergen Fasern waren bei KO und ÜE Mäusen viel geringer als die bei WT Mäusen. In der Abb. 12 sind die serotonergen Fasern der drei verschiedenen Mäuse-Linien zum Zeitpunkt E12,5 gezeigt. Bei WT Mäusen waren im mesencephalen Tegmentum (MeT) wesentlich mehr serotonerge Fasern erkennbar als bei KO und ÜE Mäusen, besonders wenig serotonerge Fasern waren bei ÜE Mäusen in dieser Region entwickelt. Wie aus der Abb. 12C hervorgeht, war die serotonerge Innervierung in den Raphe Regionen vergleichbar zwischen den drei Mäuse-Linien.

4.4.3.2 Entwicklung und Verteilung der serotonergen Fasern im cerebralen Cortex

In den Entwicklungsstadien E12,5 und E14,5 waren die serotonergen Fasern im cerebralen Cortex der drei Mäuse-Linien mit der immunhistochemischen Technik noch nicht detektierbar. Bei E16,5 Embryonen waren serotonerge Fasern im cerebralen Cortex schon deutlich erkennbar. Von E16,5 bis E18,5 erschien die serotonerge Innervierung des cerebralen Cortex bei WT Mäusen etwas ausgeprägter als die bei KO und ÜE Mäusen, während von P1,5 bis P15,5 die serotonerge Innervierung zwischen den drei Mäuse-Linien vergleichbar war (Abb. 13).

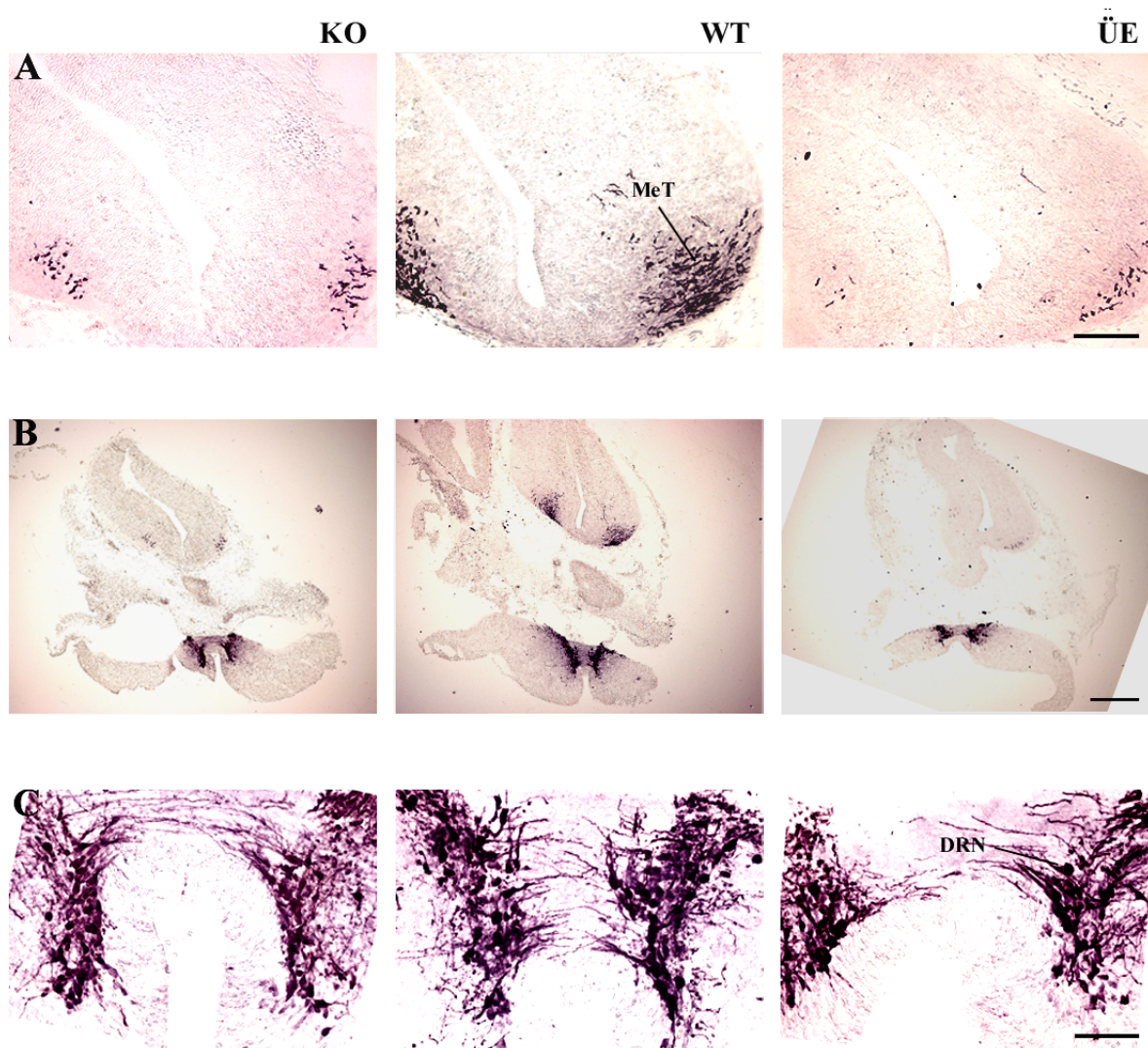


Abb. 12 Immunreaktivität der serotonergen Fasern zum Zeitpunkt E12,5 in verschiedenen Mäuse-Linien. Die Immunfärbungen der Hirnschnitte wurden mit einem polyklonalen (Kaninchen) Antikörper gegen 5-HT (1:5000) durchgeführt. **A:** Die serotonergen Fasern im **MeT**; **B:** Die koronaren Hirnschnitte in der Raphe; **C:** Die serotonergen Neurone im Nucleus raphe dorsalis (**DRN**). Die Maßstäbe entsprechen 100 µm in **A**; 300 µm in **B** ; 50 µm in **C**.

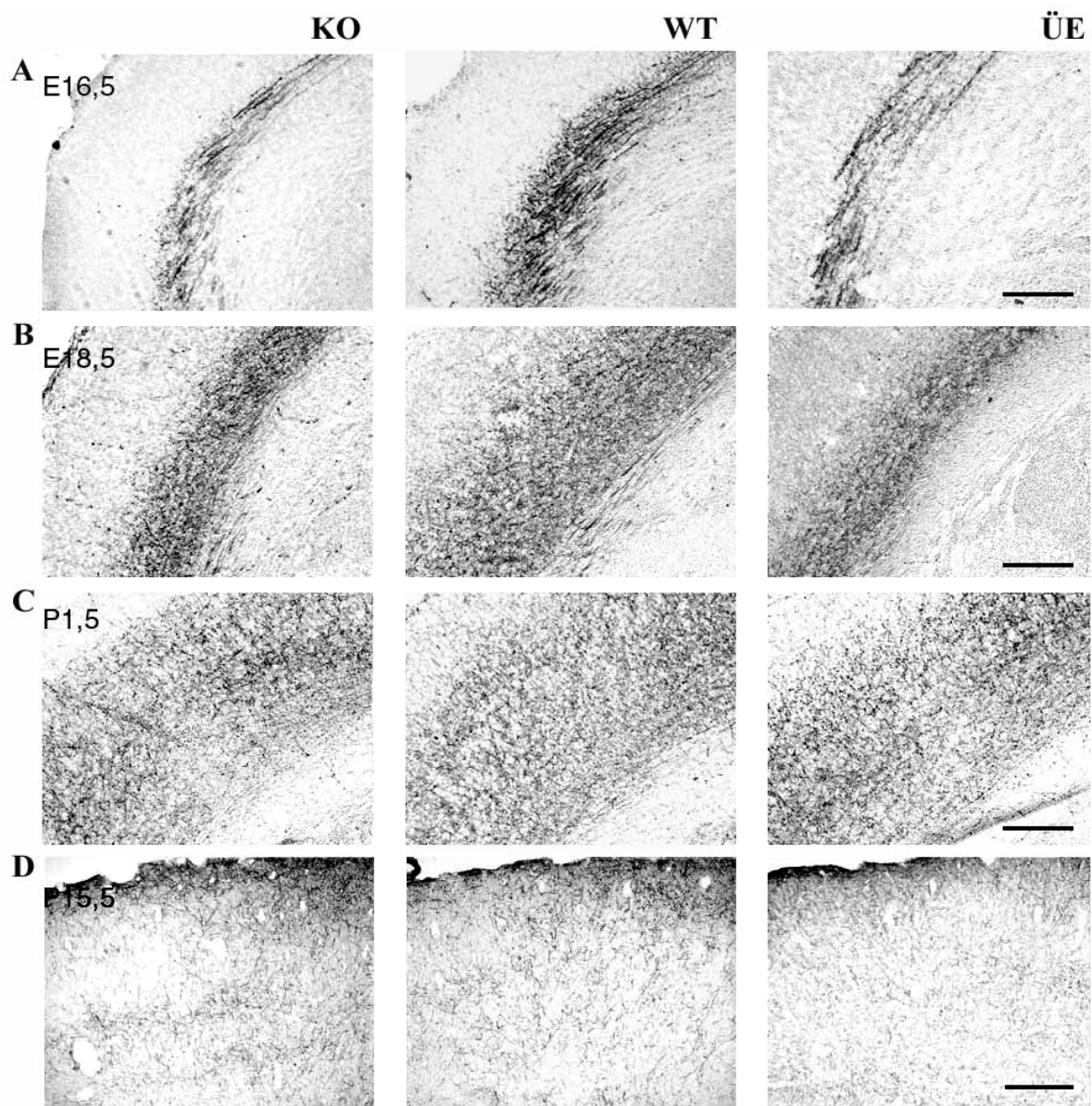


Abb. 13 Immunreaktivität der serotonergen Fasern im cerebralen Cortex der verschiedenen Mäuse-Linien in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die Immunfärbung der Hirnschnitte wurde mit einem polyklonalen (Kaninchen) Antikörper gegen 5-HT (Verdünnung: **A - C** 1:5000; **D** 1:10000) durchgeführt. **A:** E16,5; **B:** E18,5; **C:** P1,5; **D:** P15,5. Die Maßstäbe entsprechen 100 µm in **A, B, C** und **D**.

4.4.3.3 Entwicklung und Verteilung der serotonergen Fasern im Hippocampus

Während der Entwicklung von E12,5 bis E16,5 waren noch keine serotonergen Fasern im Hippocampus erkennbar. Erst bei E18,5 erschienen wenige serotonerge Fasern mit schwacher Intensität. Zum Zeitpunkt P15,5 zeigte der Hippocampus eine dichtere serotonerge Innervierung.

Zwischen den drei Mäuse-Linien bestanden keine wesentlichen Unterschiede in der Entwicklung der serotonergen Innervierung im Hippocampus (Abb. 14).

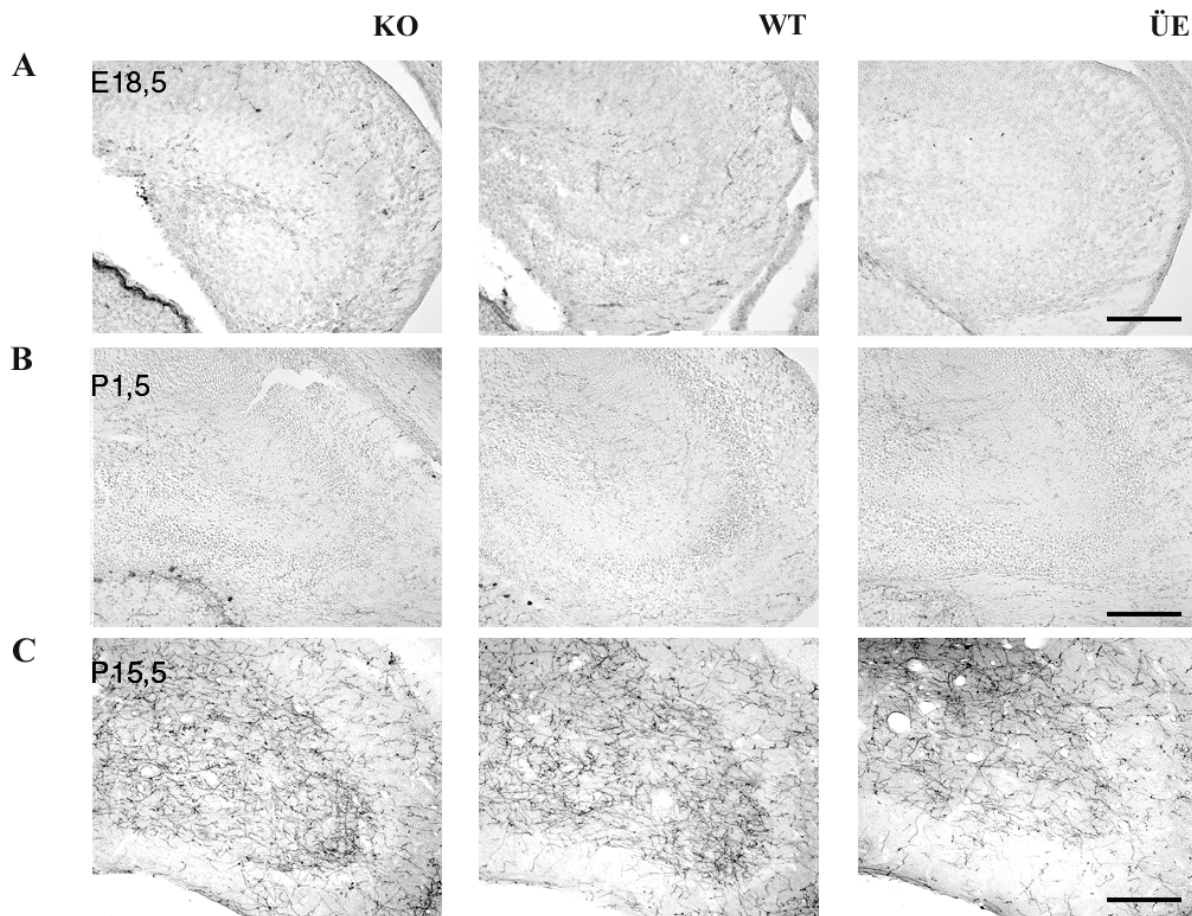


Abb. 14 Immunreaktivität der serotonergen Fasern im Hippocampus der verschiedenen Mäuse-Linien in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die Immunfärbungen der Hirnschnitte wurden mit einem polyklonalen (Kaninchen) Antikörper gegen 5-HT (Verdünnung: **A - B** 1:5000; **C** 1:10000) durchgeführt. **A:** E18,5; **B:** P1,5; **C:** P15,5. Die Maßstäbe entsprechen 100 μm in **A**, **B** und **C**.

4.4.3.4 Entwicklung und Verteilung der serotonergen Fasern im Septum

Serotonerge Fasern im Septum waren bei E12,5 Embryonen der drei Mäuse-Linien mit Immunfärbung nicht detektierbar. Von E14,5 an konnten serotonerge Fasern im Septum erkannt werden. Zum Zeitpunkt E14,5 waren nur wenige immunreaktive Fasern nachweisbar, während bei E16,5 Embryonen die Dichte der immunreaktiven Fasern deutlich zunahm. Es fielen aber keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Mäuse-Linien auf.

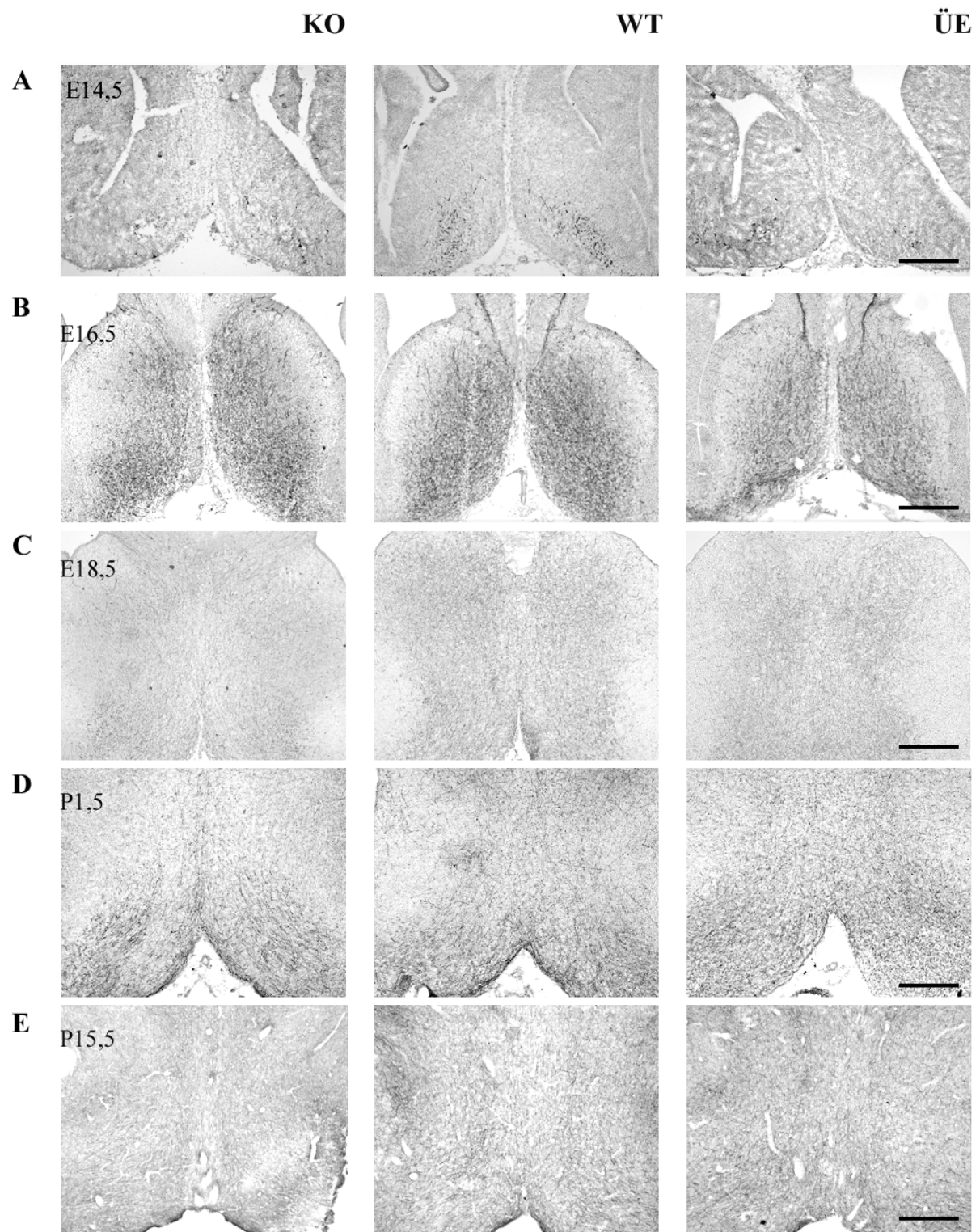


Abb. 15 Immunreaktivität der serotonergen Fasern im Septum der verschiedenen Mäuse-Linien in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die Immunfärbungen der Hirnschnitte wurden mit einem polyklonalen (Kaninchen) Antikörper gegen 5-HT (Verdünnung: **A - D** 1:5000; **E** 1:10000) durchgeführt. **A:** E14,5; **B:** E16,5; **C:** E18,5; **D:** P1,5; **E:** P15,5. Die Maßstäbe entsprechen 200 µm in **A, B, C, D** und **E**.

4.4.3.5 Entwicklung und Verteilung der serotonergen Fasern im Striatum

Von E12,5 bis P1,5 war im Striatum noch keine serotonerge Innervierung immunhistochemisch erkennbar. Zum Zeitpunkt P15,5 waren die serotonergen Fasern mittels immunhistochemischer Methode sehr gut detektierbar. Es waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Mäuse-Linien zu erkennen (Abb. 16).

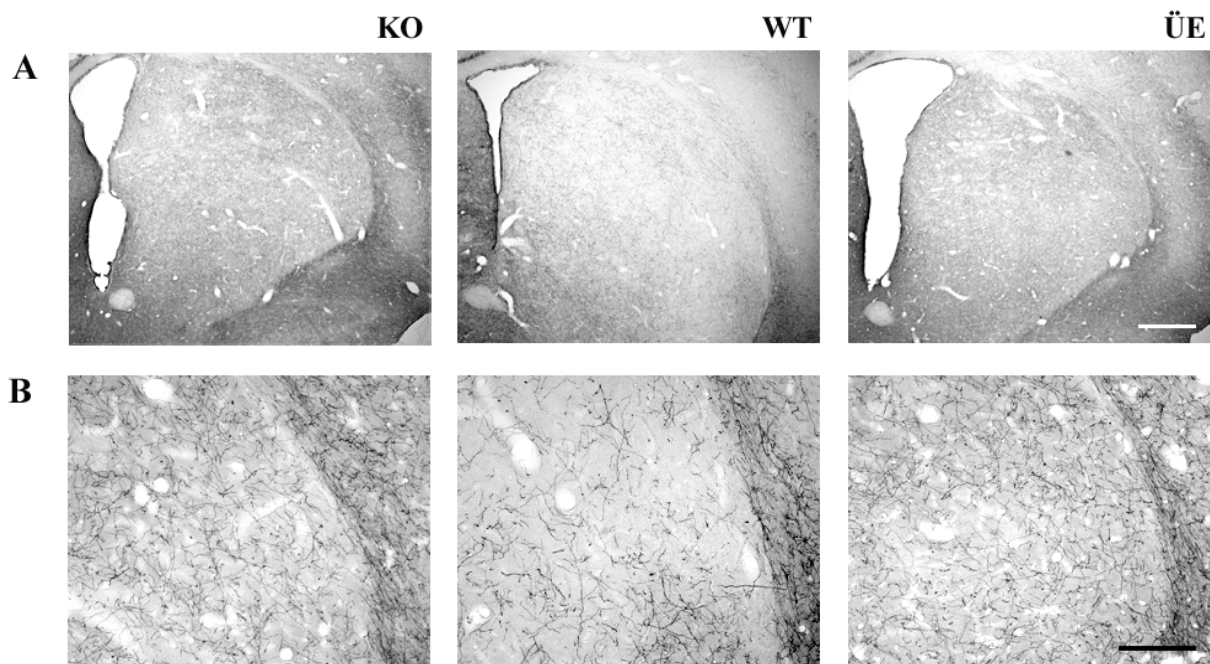


Abb.16 Immunreaktivität der serotonergen Fasern im Striatum bei P15,5 Mäusen. Die Immunfärbung der Hirnschnitte wurde mit einem polyklonalen (Kaninchen) Antikörper gegen 5-HT (Verdünnung: 1:10000) durchgeführt. Die Maßstäbe entsprechen 300 µm in **A** und 100 µm in **B**.

4.4.4 Immunreaktivität der TPH im dorsalen Raphe Nucleus

TPH ist das die Syntheserate bestimmende Enzym bei der Synthese von 5-HT aus Tryptophan. Untersucht wurde auch die Immunreaktivität der TPH bei P15,5 KO, WT und ÜE Mäusen mit einem monoklonalen Antikörper gegen TPH (Verdünnung 1:2000). Wesentliche Unterschiede bezüglich der TPH - positiven Neurone waren bei den drei Mäuse-Linien nicht zu erkennen (Abb. 17). Zum Zeitpunkt P1,5 konnte mit dem von uns verwendeten Antikörper auch bei Einsatz eines höheren Antikörpertiters (1:500) keine Immunreaktion ausgelöst werden.

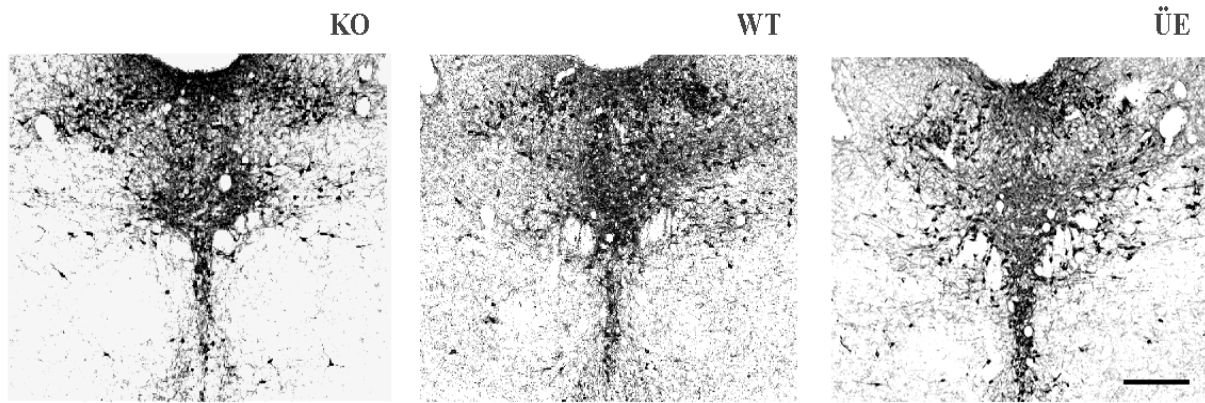


Abb. 17 Immunreaktivität der TPH in den Raphe Nuclei bei den verschiedenen Mäuse-Linien. Die TPH positive Neurone wurden mit einem monoklonalen (Maus) Antikörper gegen TPH untersucht. Die Maßstäbe entsprechen 200 μm .

4.4.5 Vergleich der catecholaminergen Neurone in den drei Mäuse-Linien

Die Zellkörper der dopaminergen Neurone sind hauptsächlich in der Substantia nigra compacta (SNC) und im ventralen tegmental Areal (VTA), die sich nahe nebeneinander im Mesencephalon befinden, lokalisiert. Dopaminerge Zellen sind auch im Bulbus olfactorius vorhanden. Die Axone projizieren in das Striatum, in limbische und frontale corticale Regionen. Die Zellkörper der noradrenergen Neurone sind im Locus coeruleus (LC) lokalisiert. Wir konzentrierten uns daher auf diese Hirnregionen.

4.4.5.1 Entwicklung der dopaminergen Neurone im Bulbus olfactorius

Im Bulbus olfactorius bestand eine ausgeprägte TH Immunreaktivität. Die Immunreaktivität der Neurone waren in den drei Mäuse-Linien während der jeweiligen Entwicklungsstadien vergleichbar (Abb. 18).

4.4.5.2 Entwicklung der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra compacta und dem ventralen Tegmentum der drei Mäuse-Linien

Sowohl in der Substantia nigra compacta als auch im ventralen Tegmentum konnten intensiv angefärbte TH-immunreaktive Neurone und Fasern detektiert werden. Während der Entwicklungsstadien waren keine wesentlichen Unterschiede im Nachweis der dopaminergen Neurone und Fasern in der Substantia nigra und im ventralen Tegmentum zwischen den drei Mäuse-Linien zu erkennen. Nur zum Zeitpunkt E12,5 war die Immunreaktivität in der Substantia nigra bei WT Embryonen etwas stärker ausgeprägt (Abb. 19).

4.4.5.3 Entwicklung der noradrenergen Neurone in den drei Mäuse-Linien

Die Lokalisation der noradrenergen Neurone im LC wurde auch mittels einer anti-TH-Immunfärbung gezeigt. Wie in den dopaminergen Neuronen des Mesencephalons war die Immunreaktivität der noradrenergen Neurone im LC auch sehr intensiv. In dem frühen Entwicklungsstadium (E12,5) waren bereits einige immunreaktive Zellen erkennbar. Die Zahl der Zellen nahm kontinuierlich zu. Aus der Abb. 20 geht hervor, dass zu Zeitpunkten E14,5, E16,5, E18,5 und P1,5 die Immunfärbung der noradrenergen Neurone im LC zwischen den drei verschiedenen Mäuse-Linien vergleichbar war. Im Vergleich zu den WT und KO Mäusen war die Immunreaktivität bei P15,5 ÜE Mäusen am stärksten erkennbar (Abb. 20).

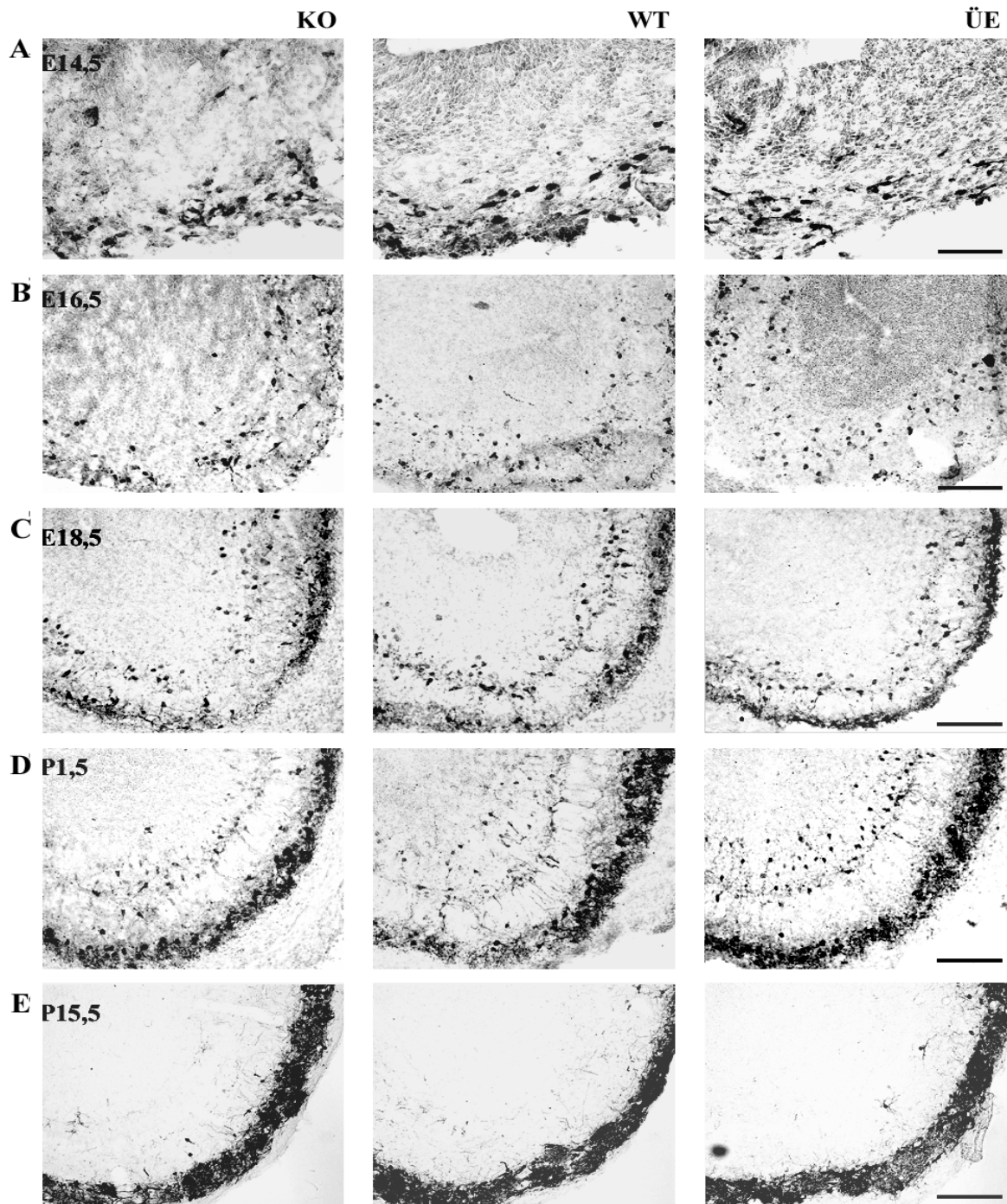


Abb. 18 Immunreaktivität der dopaminergen Neurone im Bulbus olfactorius bei den verschiedenen Mäuse-Linien in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die koronaren Hirnschnitte wurden mit einem polyklonalen (Kaninchen) Antikörper gegen TH (Verdünnung: **A - D** 1:500; **E** 1:2000) untersucht. **A:** E14,5; **B:** E16,5; **C:** E18,5; **D:** P1,5; **E:** P15,5. Die Maßstäbe entsprechen 50 µm in **A** und **B**; 100 µm in **C**, **D** und **E**.

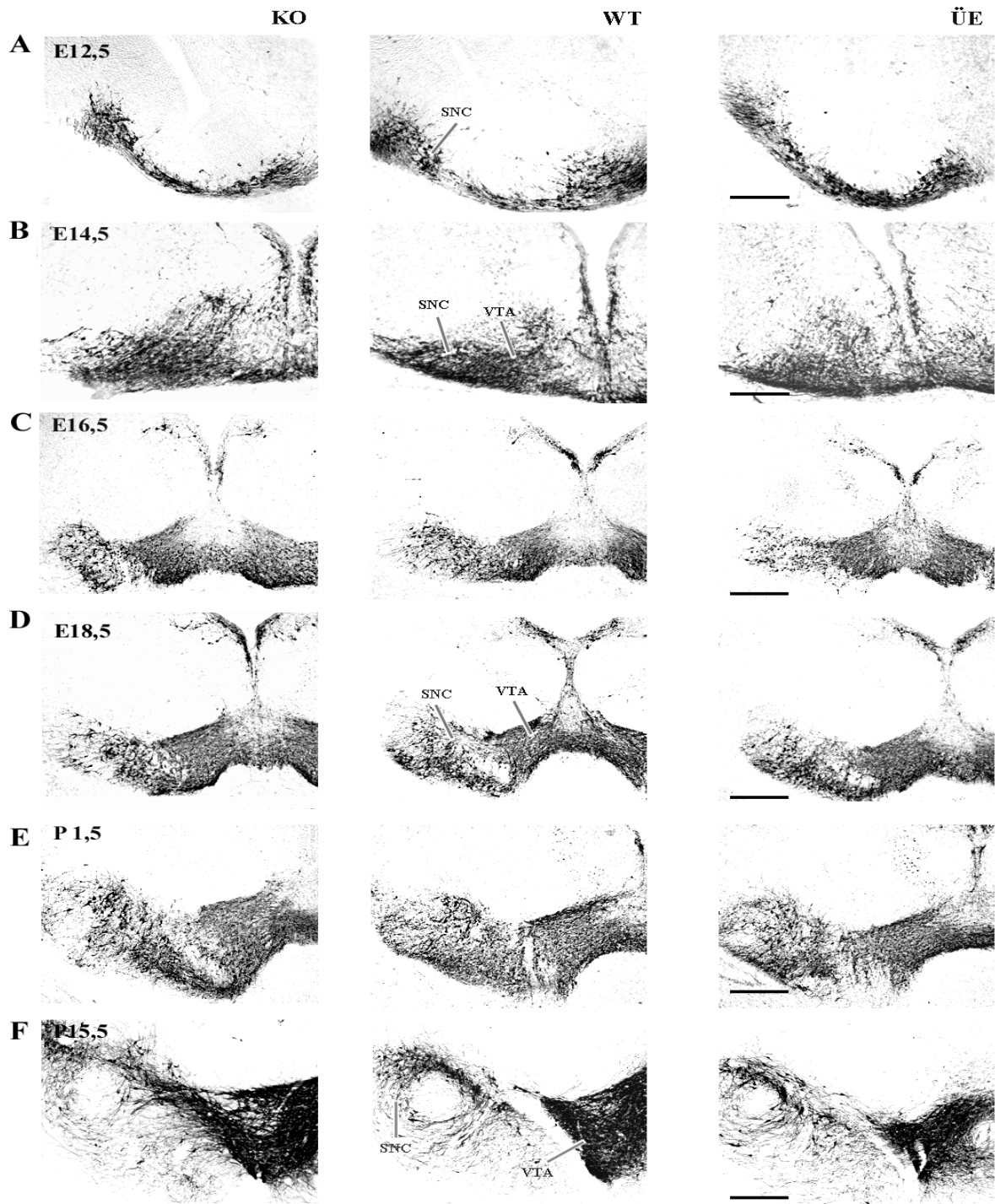


Abb. 19 Immunreaktivität der dopaminergen Neurone und Fasern bei den verschiedenen Mäuse-Linien in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die koronaren Hirnschnitte wurden mit einem polyklonalen (Kaninchen) Antikörper gegen TH (Verdünnung: **A - E** 1:500; **F** 1:2000) untersucht. Die TH positiven Neurone und Fasern wurden in der Substantia nigra compacta (**SNC**) und dem ventralen Tegmentum (**VTA**) gefärbt. **A:** E12,5; **B:** E14,5; **C:** E16,5; **D:** E18,5; **E:** P1,5; **F:** P15,5. Die Maßstäbe entsprechen 100 µm in **A** und **B**; 200 µm in **C**, **D**, **E** und **F**.

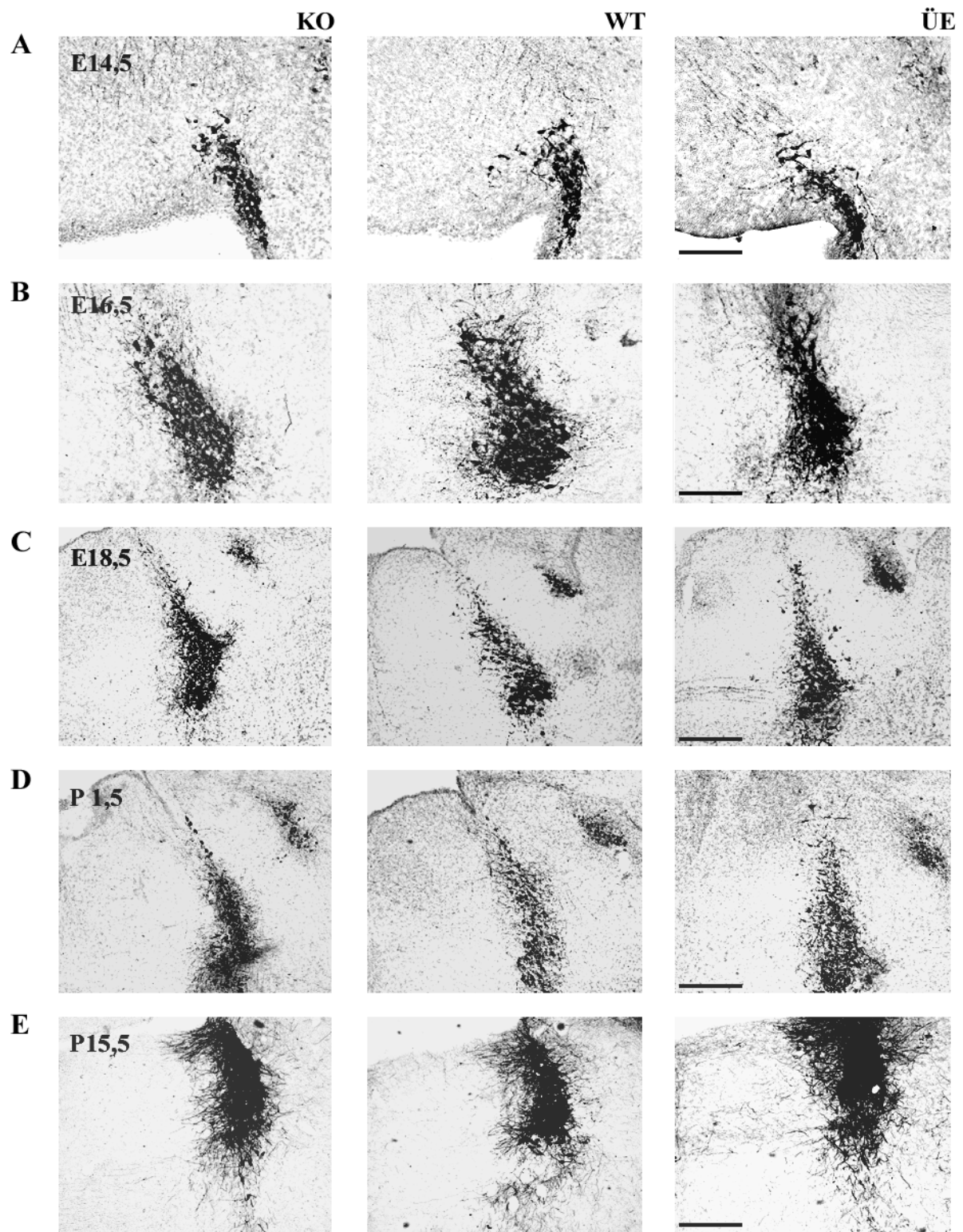


Abb. 20 Immunreaktivität der noradrenergen Neurone bei KO, WT und ÜE Mäusen in verschiedenen Entwicklungsstadien. Die noradrenergen Neurone im LC wurden mit einem polyklonalen (Kaninchen) Antikörper gegen TH (Verdünnung: **A - D** 1:500; **E** 1:2000) untersucht. **A:** E14,5; **B:** E16,5; **C:** E18,5; **D:** P1,5; **E:** P15,5. Die Maßstäbe entsprechen 200 μ m in **A, B, C, D** und **E**.

4.4.6 Vergleich des S100 β Proteins im Gehirn der verschiedenen Mäuse-Linien zum Zeitpunkt P15,5

S100 β Protein, ein neurotropher Faktor, ist in Glialzellen lokalisiert und wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem monoklonalen (Maus) Antikörper (Verdünnung 1:2000) in koronaren Hirnschnitten bei P15,5 Mäusen untersucht. Die S100 β Protein positiven Glialzellen zeigten im Hippocampus und Striatum eine starke Immunreaktion. Bei ÜE Mäusen waren mehr positive Glialzellen in beiden Regionen erkennbar als bei WT und KO Mäusen (Abb. 21). Zum Zeitpunkt P1,5 konnte mit dem von uns verwendeten Antikörper auch bei Einsatz eines höheren Antikörpertiters (1:500) keine Immunreaktion ausgelöst werden.

4.4.7 Vergleich von MBP im Gehirn der drei Mäuse-Linien zum Zeitpunkt P15,5

Das MBP wurde mittels Immunhistochemie bei P15,5 Mäusen nachgewiesen. Die Immunreaktivität der MBP hältigen Fasern war im Frontalcortex, Hippocampus und Septum besonders hoch. Wesentliche Unterschiede waren zwischen den drei verschiedenen Mäuse Linien nicht zu erkennen (Abb. 22). Mit dem von uns verwendeten Antikörper auch bei Einsatz eines höheren Antikörpertiters (1:500) konnte keine Immunreaktion von MBP zum Zeitpunkt P1,5 detektiert werden.

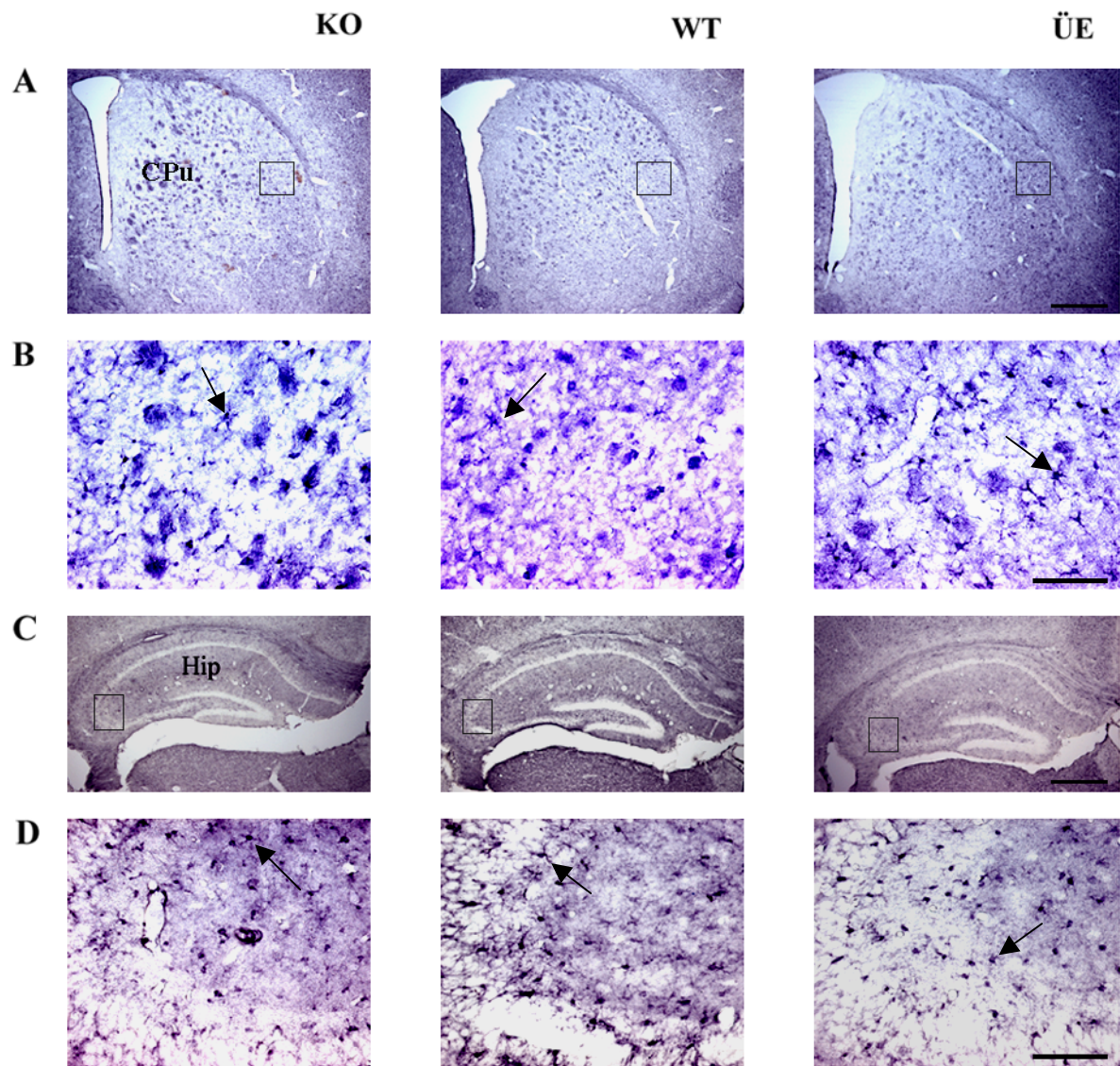


Abb. 21 Immunreaktivität des S100 β Proteins in den Glialzellen bei P15,5 KO, WT und ÜE Mäusen. **A-B:** S100 β Protein positive Glialzellen im Striatum (Caudatus/Putamen, **CPu**). **C-D:** S100 β Protein positive Glialzellen im Hippocampus (**Hip**). Bei ÜE Mäusen waren mehr Glialzellen gefärbt. Der Pfeil zeigt S100 β Protein positive Gliazelle. Das Rechteck demonstriert die Region der Vergrößerung. Die Maßstäbe entsprechen 300 μ m **A** und **C**; 50 μ m in **B** und **D**.

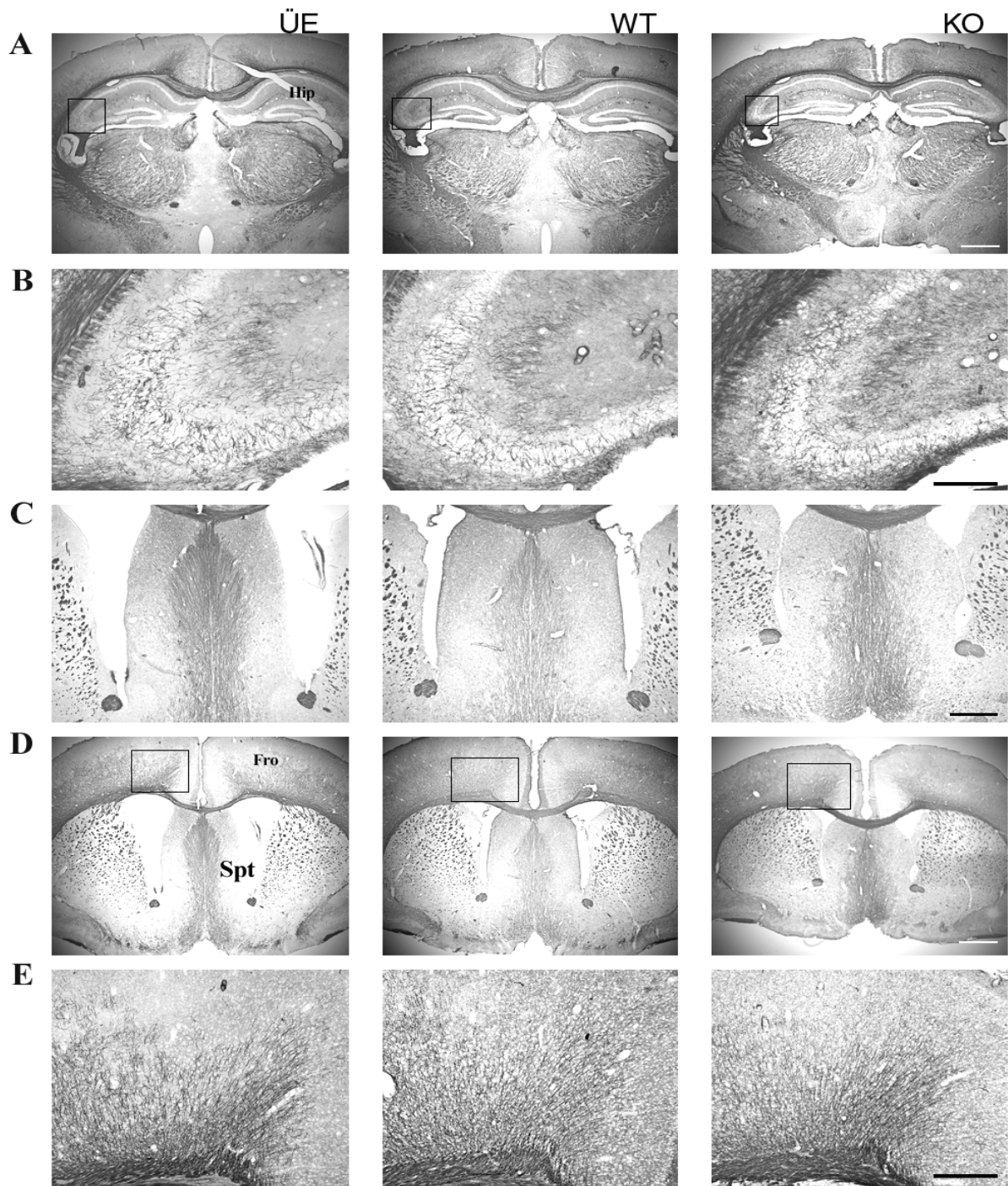


Abb. 22 Immunreaktivität von MBP bei den verschiedenen P15,5 Mäuse-Linien. Die koronaren Hirnschnitte wurden mit einem monoklonalen (Maus) Antikörper (Verdünnung 1:2000) gegen MBP untersucht. Die starke Immunfärbung der MBP Fasern wird im Hippocampus, Frontalcortex und Septum der verschiedenen Mäuse-Linien gezeigt. **A, B:** Hippocampus (**Hip**), **C:** Septum (**Spt**); **D, E:** Frontalcortex (**Fro**). Das Rechteck zeigt den Ausschnitt der Vergrößerung im Hippocampus und Frontalcortex. Die Maßstäbe entsprechen 500 µm in **A** und **D**; 100 µm in **B** und **E**; 300 µm in **C**.

4.5 Proteinexpression bei verschiedenen Entwicklungsstadien im Gehirn der drei MäuseLinien

4.5.1 Western Blot-Analyse des TH Proteins

Bei der Western Blot-Analyse war im Homogenat des Gesamthirns nach Behandlung mit einem polyklonalen (Kaninchen) Antikörper gegen TH eine spezifische Bande bei 56 kDa ab E12,5 detektierbar. In der Abb. 23A ist die Bande des TH Proteins von E12,5 bis P15,5 bei den verschiedenen Mäuse-Linien dargestellt. Die Banden von 3 – 4 verschiedenen Homogenaten wurden mittels LabImage® Software zur Analyse und Dokumentation von Elektrophorese Gelen (Kapelan) semiquantifiziert, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mäuse-Linien zu erkennen waren (Abb. 23B).

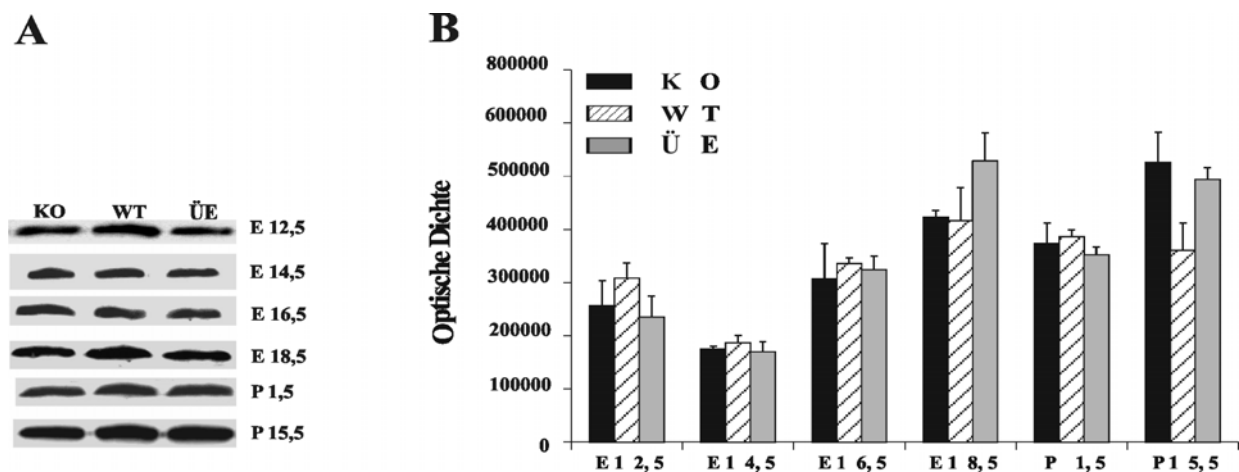


Abb. 23 Nachweis des TH Proteins bei KO, WT und ÜE Mäusen in den verschiedenen Entwicklungsstadien mittels Western Blot. **A:** TH Banden von 56 kDa. Pro Geltasche wurden gleiche Mengen Proteine (jeweils 30 µg) in einem 10% SDS-PAGE aufgetragen, geblottet und mit einem polyklonalem anti-TH Antikörper inkubiert. **B:** Die Semiquantifizierung der Banden erfolgte mittels LabImage® Software (n = 3 – 4; p > 0,05).

4.5.2 Western Blot-Analyse verschiedener synaptischer, vesikel-revanter Proteine

Die Detektierung von verschiedenen synaptischen, vesikel-relevanten Proteinen erfolgte mittels Western Blot mit spezifischen Antikörpern. Synaptobrevin hat eine typische Bande im Blot bei 18 kDa, SNAP-25 bei 25 kDa, Synaptophysin bei 38 kDa und Synaptotagmin bei 65 kDa. Die Banden wurden mit LabImage® Software zur Analyse und Dokumentation von Elektrophorese-

Gelen (Kapelan) semiquantifiziert. In den Gehirnen von E12,5 KO, WT und ÜE Mäusen konnte Synaptophysin nicht detektiert werden. Die Immunreaktivität der Banden von Synaptobrevin, Synaptotagmin und SNAP-25 waren bei WT Mäusen intensiver als die bei KO und ÜE Mäusen. Von E14,5 bis zum P15,5 war die Intensität der Immunreaktivität von Synaptobrevin und Synaptophysin bei den drei Mäuse-Linien vergleichbar (Abb. 24). Die Semiquantifizierung der Banden von drei verschiedenen Homogenaten / Gruppe ergab keine signifikanten Unterschiede (Ergebnisse nicht gezeigt).

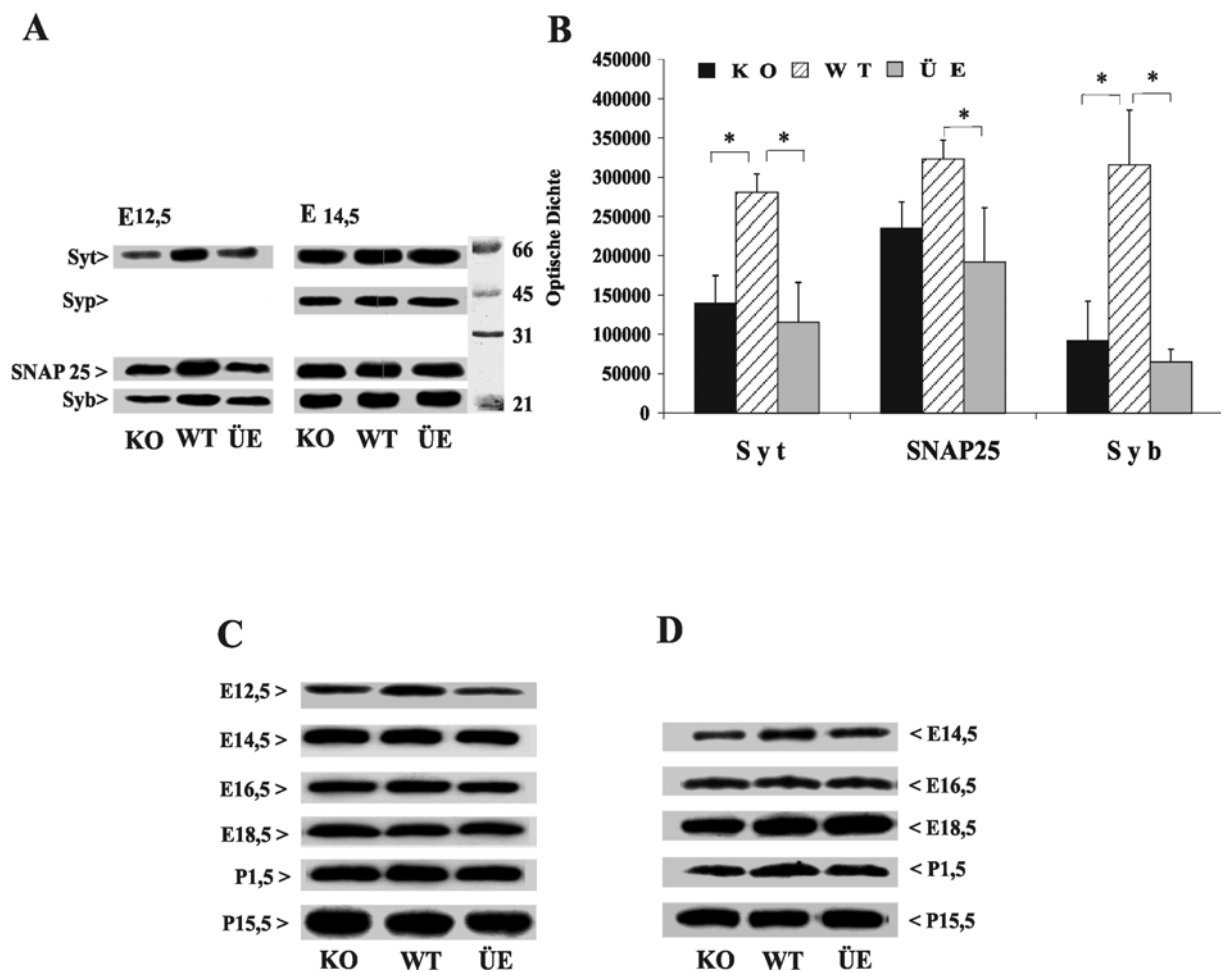


Abb. 24 Nachweis verschiedener synaptischer, vesikel-relevanter Proteine bei den verschiedenen Mäuse-Linien in unterschiedlichen Entwicklungsstadien mittels Western Blot. **A:** Proteinbanden von Synaptobrevin (Syb), SNAP-25, Synaptophysin (Syp), und Synaptotagmin (Syt) bei E12,5 und E14,5 Mäusen. **B:** Semiquantifizierung der Banden bei den E12,5 Mäusen mittels LabImage® Software zur Analyse und Dokumentation von Elektrophorese-Gelen (Kapelan); n = 3, *p< 0,05 vs WT. **C:** Synaptobrevin Proteine von E12,5 bis P15,5. **D:** Synaptophysin Proteine von E14,5 bis P15,5.

4.5.3 Western Blot-Analyse von MBP

Die Expression von MBP im Gehirn wurde mittels Western Blot bei den drei Mäuse-Linien untersucht. Zum Zeitpunkt P15,5 wurde MBP im Homogenat des Gesamthirns mit dem monoklonalen (Maus) MBP Antikörper (Verdünnung 1:2000) als spezifische Bande bei 27 kDa detektiert. Zwischen den drei Mäuse-Linien waren keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen (Abb. 25). Zu einem früheren Zeitpunkt (P1,5) war das MBP mittels Western Blot bei Einsatz eines höheren Antikörpertiters (1:1000) noch nicht detektierbar.

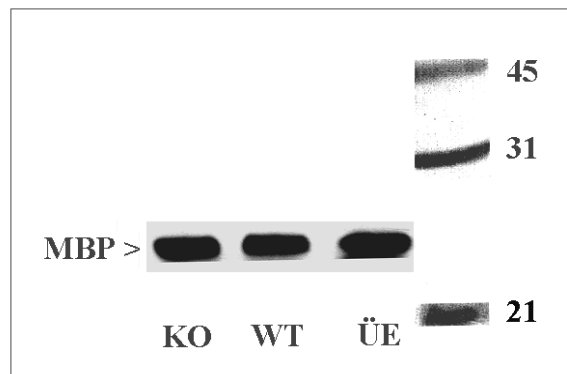


Abb.25 Nachweis von MBP bei den verschiedenen Mäuse-Linien im Western Blot zum Zeitpunkt P15,5. Die MBP Bande von 27 kDa ist gezeigt. 20 µg Protein wurden pro Tasche aufgetragen und die Membran mit monoklonalem anti-MBP (1:2000) inkubiert. Die Zahlen an der rechten Seite geben den SDS-PAGE Standard in kDa an.

4.6 Quantitative Bestimmung der Monoamin-Transmitter und deren Metabolite im Gehirn der KO, WT und ÜE Mäuse mittels HPLC-ED

4.6.1 Unterschiedliche Gewebskonzentrationen von 5-HT und 5-HIAA im Gehirnwährend der verschiedenen Entwicklungsstadien

Von E12,5 bis P1,5 erfolgte die Bestimmung von 5-HT und 5-HIAA im Homogenat des Gesamthirns, während bei den P15,5 Gehirnen verschiedene Subregionen untersucht wurden. In der Abb. 26 wird gezeigt, dass die Konzentrationen / mg Gewebe von 5-HT und 5-HIAA der verschiedenen Mäuse-Linien von E12,5 bis P1,5 allmählich zunahmen. Bei E12,5 Embryonen waren die Konzentrationen von 5-HT zwischen den drei Mäuse-Linien vergleichbar, während die Konzentrationen von 5-HIAA bei ÜE Mäusen höher als bei KO Mäusen waren. Zum Zeitpunkt E14,5 waren die Konzentrationen von 5-HT und 5-HIAA zwischen den drei Mäuse-

Linien vergleichbar. Bei E16,5 Embryonen waren die Konzentrationen von 5-HT bei ÜE Mäusen höher als bei WT und KO Mäusen und zwischen den WT und KO Mäusen vergleichbar; bei den Konzentrationen von 5-HIAA waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Mäuse-Linien erkennbar. Zum Zeitpunkt E18,5 waren die Konzentrationen von 5-HT bei ÜE Mäusen höher als bei WT Mäusen, während die Konzentrationen von 5-HIAA bei KO Mäusen höher als bei WT Mäusen waren. Zwischen ÜE und KO Mäuse bestanden keine signifikanten Unterschiede. Bei P1,5 ÜE Mäusen waren die Gewebsspiegel von 5-HT und 5-HIAA höher als bei WT und KO Mäusen. Auch bei KO Mäusen waren die Konzentrationen von 5-HT und 5-HIAA höher als bei WT Mäusen (Abb. 26A und B). Der Turnover von 5-HT, berechnet aus der molaren Ratio von 5-HIAA/5-HT waren von E12,5 bis E18,5 zwischen den drei Mäuse-Linien vergleichbar. Zum Zeitpunkt P1,5 war der Turnover von 5-HT sowohl bei KO Mäusen als auch bei ÜE Mäusen höher als bei WT Mäusen (Abb. 26C).

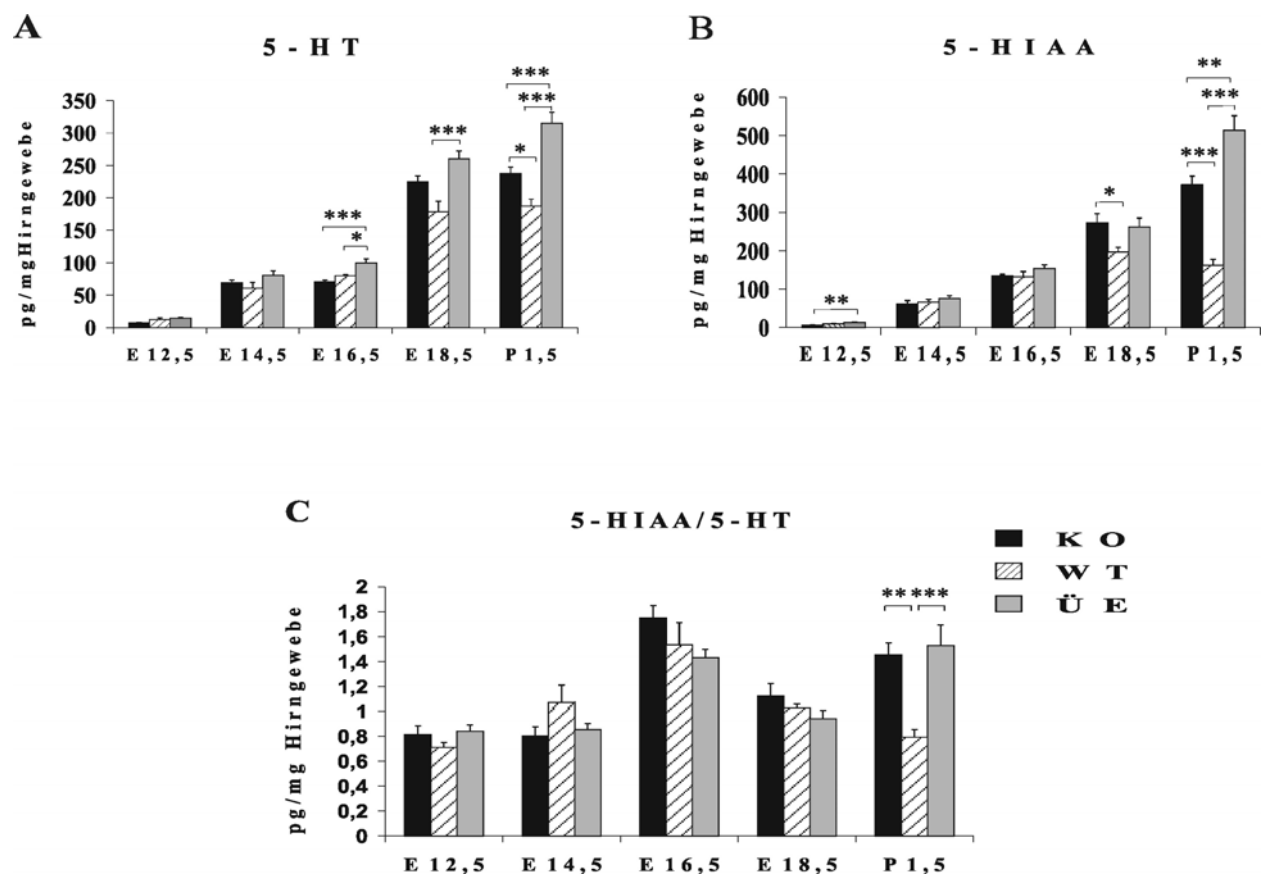


Abb.26 Vergleich der Gewebsspiegel von 5-HT und 5-HIAA im Gehirn während der Entwicklungsstadien von E12,5 bis P1,5 bei den verschiedenen Mäuse-Linien. **A:** 5-HT (pg/mg Hirngewebe). **B:** 5-HIAA (pg/mg Hirngewebe). **C:** Molare Ratio von 5-HIAA/5-HT. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben (n=6). Statistische Auswertung wurde mittels one-way ANOVA mit dem Tukey's post hoc-Test durchgeführt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.6.2 Unterschiedliche Gewebskonzentrationen von DA und NA im Gehirn während der Entwicklungsstadien

In der Entwicklungsstadien E12,5 bis P1,5 nahmen die Konzentrationen von DA und NA im Gehirn bei den drei Mäuse-Linien zu. Von E12,5 bis E18,5 waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Mäuse-Linien zu erkennen. Zum Zeitpunkt P1,5 waren die Konzentrationen von DA und NA bei ÜE Mäusen höher als bei WT und KO Mäusen (Abb. 27).

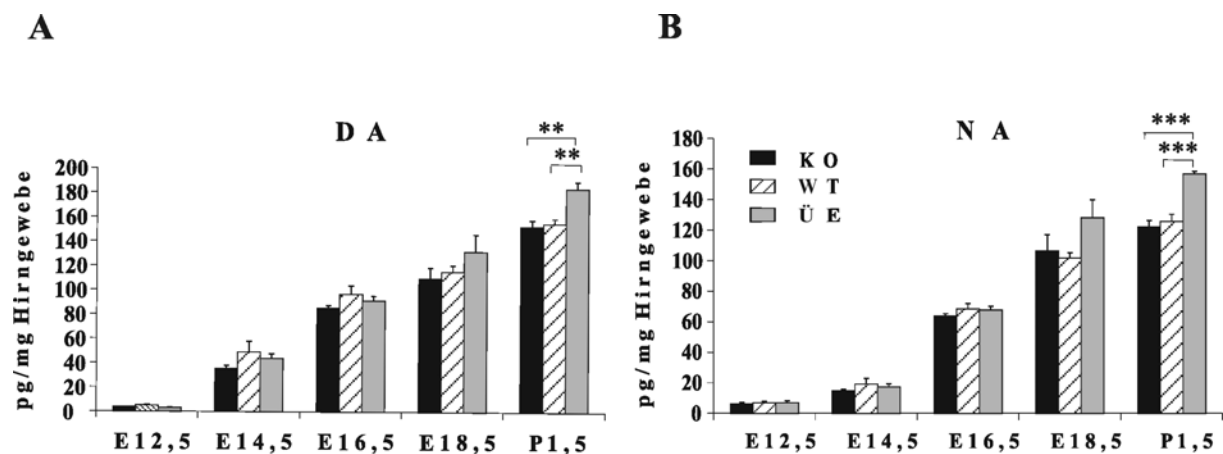


Abb. 27 Vergleich der Konzentrationen von DA und NA im Gehirn während der Entwicklungsstadien bei den verschiedenen Mäuse-Linien. **A:** DA (pg/mg Hirngewebe) **B:** NA (pg/mg Hirngewebe). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben (n=6). Statistische Auswertung wurde mittels one-way ANOVA mit dem Tukey's post hoc-Test durchgeführt. ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4.6.3 Bestimmung der Gewebskonzentrationen von 5-HT und 5-HIAA in verschiedenen Hirnregionen bei den drei Mäuse-Linien zum Zeitpunkt P15,5

Bei den Gehirnen der P15,5 Mäuse wurden verschiedenen Regionen wie Bulbus olfactorius, Frontalcortex, Striatum, Hippocampus, Hypothalamus präpariert und in den jeweiligen Regionen die Konzentrationen von 5-HT und 5-HIAA gemessen. Im Hypothalamus waren die Gewebsspiegel von 5-HT und 5-HIAA im Vergleich zu den anderen Regionen am höchsten. Die 5-HT Konzentrationen waren bei ÜE Mäusen höher als bei WT und KO Mäusen und auch bei KO Mäusen höher als die bei WT Mäusen, wobei die Konzentrationen von 5-HIAA bei WT Mäusen niedriger waren als bei KO und ÜE Mäusen. Im Striatum waren die Konzentrationen von 5-HT und 5-HIAA bei KO Mäusen höher als die bei WT Mäusen. In den weiteren

untersuchten Regionen gab es keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Konzentrationen von 5-HT und 5-HIAA zwischen den drei Mäuse-Linien (Abb. 28A und B). Der Turnover von 5-HT war nur im Bulbus olfactorius bei KO Mäusen höher als bei WT und ÜE Mäusen und in den von uns untersuchten Subregionen zwischen den drei Mäuse-Linien vergleichbar (Abb. 28C).

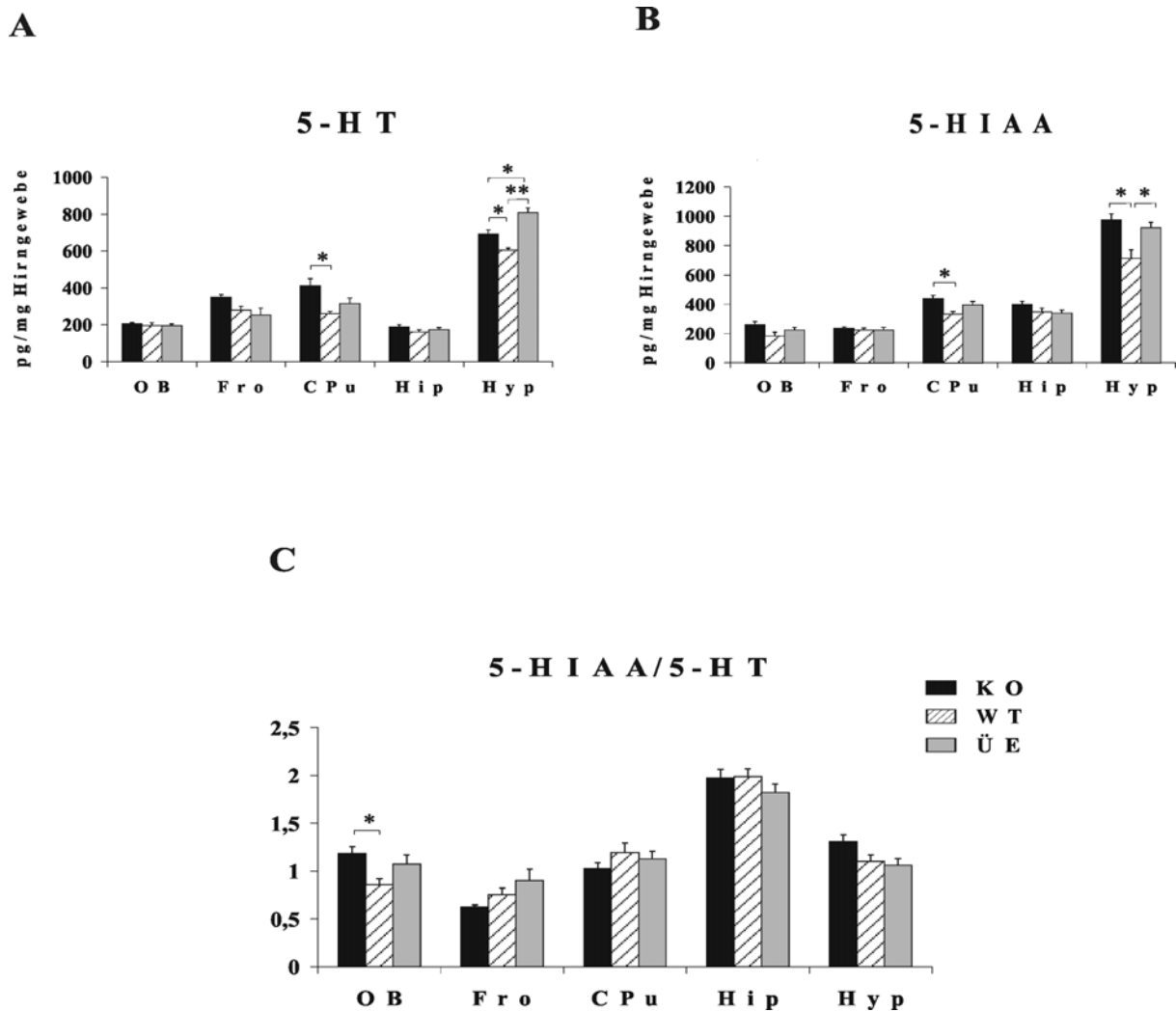


Abb.28 Vergleich der Konzentrationen von 5-HT und 5-HIAA und der Turnover von 5-HT in verschiedenen Hirnregionen zwischen P15,5 KO, WT und ÜE Mäusen. Die Bestimmung erfolgte in den Regionen Bulbus olfactorius (**OB**), Frontalcortex (**Fro**), Striatum (Caudatus/Putamen, **CPu**), Hippocampus (**Hip**) und Hypothalamus (**Hyp**). **A**: 5-HT (pg/mg Hirngewebe) **B**: 5-HIAA (pg/mg Hirngewebe). **C**: Molare Ratio von 5-HIAA / 5-HT. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben (n = 6). Statistische Auswertung wurde mittels one-way ANOVA mit dem Tukey's post hoc-Test durchgeführt; * p < 0,05, ** p < 0,01.

4.6.4 Bestimmung der Konzentrationen von DA, DOPAC und NA in verschiedenen Hirnregionen bei den drei Mäuse-Linien zum Zeitpunkt P15,5

Die Konzentrationen von DA, DOPAC und NA wurden im Gehirn der P15,5 Mäuse in den Regionen Bulbus olfactorius, Frontalcortex, Striatum, Hippocampus, Hypothalamus untersucht (Abb. 29). Die Konzentrationen von DA waren im Striatum am höchsten im Vergleich zu den anderen Regionen und bei KO Mäusen höher als die bei WT und ÜE Mäusen. Im Frontalcortex konnte DA nicht detektiert werden. In anderen Regionen waren die Gewebsspiegel von DA zwischen den drei Mäuse-Linien vergleichbar. Bezüglich der Konzentrationen von DOPAC im Striatum gab es keine wesentlichen Unterschiede zwischen den KO, WT und ÜE Mäusen. Im Bulbus olfactorius, Frontalcortex, Hippocampus, und Hypothalamus waren nur geringe DOPAC-Spiegel detektierbar und in den drei Mäuse-Linien vergleichbar.

Die höchste NA Gewebsspiegel aller Regionen wurden im Hypothalamus gefunden. Die Konzentrationen von NA waren bei ÜE Mäusen höher als bei WT und KO Mäusen. Im Striatum war NA nicht detektierbar. In den anderen Regionen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Mäuse-Linien erkennbar.

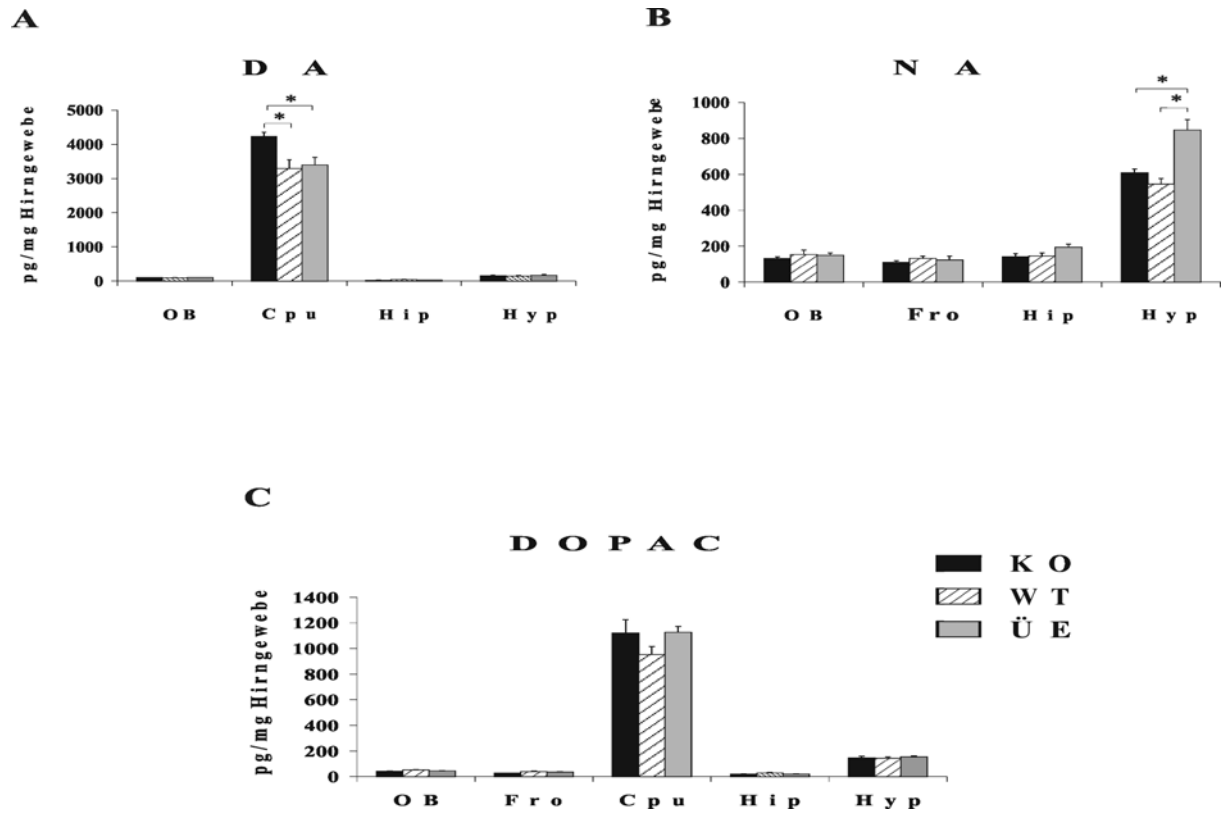


Abb. 29 Vergleich der Konzentrationen von DA, DOPAC und NA in verschiedenen Hirnregionen zwischen P15,5 KO, WT und ÜE Mäusen. Die Bestimmung erfolgte in den Regionen Bulbus olfactorius (**OB**), Frontalcortex (**Fro**), Striatum (Caudatus/Putamen, **CPu**), Hippocampus (**Hip**) und Hypothalamus (**Hyp**). **A:** DA (pg/mg Hirngewebe) **B:** NA (pg/mg Hirngewebe). **C:** DOPAC (pg/mg Hirngewebe). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben ($n = 6$). Statistische Auswertung wurde mittels one-way ANOVA mit dem Tukey's post hoc-Test durchgeführt; * $p < 0,05$.

5 DISKUSSION

5.1 Unterschiedliche Expression des 5-HT_{1A} Rezeptors bei den drei Mäuse-Linien

In der vorliegenden Arbeit haben wir Rezeptorautoradiographie mit dem selektiven Radioligand [H^3]8-OH-DPAT durchgeführt, um Unterschiede in der Expression des 5-HT_{1A} Rezeptors bei den drei Mäuse-Linien nachzuweisen. Bei P15,5 KO Mäusen war keine Liganden-Bindung, sowohl in der Raphe, als auch im Cortex, Hippocampus und Septum zu erkennen. Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die präsynaptischen, sondern auch die postsynaptischen 5-HT_{1A} Rezeptoren bei den KO Mäusen inaktiv waren. Dies stimmt mit den an adulten KO Mäusen erhobenen Autoradiographie-Ergebnissen überein (Ramboz et al., 1998; Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998). Bei den Gehirnen der ÜE Mäuse waren die Dichte der Rezeptorbindung für den 5-HT_{1A} Rezeptor nur zum Zeitpunkt P1,5 im Septum, Hippocampus und Cortex höher als die bei WT Mäusen. Kusserow et al (2003) haben nachgewiesen, dass die Expression des endogenen 5-HT_{1A} Rezeptors zum Zeitpunkt P7,5 nicht mehr eindeutig höher als bei WT Mäusen ist. Diese Untersuchungen zeigen, dass eine Überexpression des 5-HT_{1A} Rezeptors nur vorübergehend in der früheren postnatalen Periode besteht und in der späteren Entwicklung möglicherweise kompensiert wird. Auch bei der adulten ÜE Maus konnten Kusserow et al. (2003) keine Unterschiede in der Rezeptorautoradiographie zwischen ÜE und WT Mäusen finden. Bei KO Mäusen konnte durch eine gewebspezifische und konditionelle Wiederherstellung der Expression des 5-HT_{1A} Rezeptors während der frühpostnatalen Phase das erhöhte Angstverhalten wieder normalisiert werden (Gross et al., 2002). Diese Studie zeigt, dass die Expression des 5-HT_{1A} Rezeptors während der frühpostnatalen Perioden sehr wichtig für die Etablierung des normalen Angstverhaltens in der adulten Maus ist.

5.2 Entwicklung des serotonergen Systems im Gehirn bei den drei Mäuse-Linien

5.2.1 Generelle Entwicklung des Gehirns

Als grobes Mass für die embryonale Entwicklung des Gehirns wurden das Gewicht und die Morphologie der Gehirne herangezogen. Das Gewicht der Gehirne war zwischen KO, WT und ÜE Mäusen während der Entwicklungsperioden von E12,5 bis P1,5 vergleichbar. Bezüglich der KO Mäuse entspricht dieser Befund den bei adulten Tieren beschriebenen Ergebnissen (Heisler et al., 1998). In dieser Studie wurde gezeigt, dass das Hirngewicht der adulten Mäuse zwischen WT, heterozygoten und homozygoten KO Mäusen vergleichbar war. Dies ist ein grober Hinweis

dafür, dass die generelle Entwicklung des Gehirns durch die transgenen Veränderungen nicht wesentlich beeinflusst wird. Auch die in den histologischen Untersuchungen erhobenen Befunde zeigen bei den drei Mäuse-Linien keine wesentlichen Unterschiede im Aufbau des Gehirns während der verschiedenen Entwicklungsphasen. Die histologische Architektur des Gehirns entsprach bei allen drei Mäuse-Linien den von Jacobowitz und Abbott (1997) gezeigten Strukturen des sich entwickelnden Mäusehirns.

5.2.2 Embryonale und frühpostnatale Entwicklung des serotonergen Systems

Es ist bekannt, dass bei der Maus serotonerge Neurone erstmalig zum Zeitpunkt E 11,5 erkennbar sind (Briscoe et al., 1999). Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Zellkörper der serotonergen Neurone zum Zeitpunkt E12,5 in den Raphe Nuclei sowohl bei KO als auch bei ÜE Mäusen in gleichem Ausmaß wie bei WT Mäusen entwickelt sind. Es waren auch keine wesentlichen Unterschiede in Bezug auf die weitere Entwicklung der serotonergen Neurone in den verschiedenen Raphekernen während der Entwicklungsperioden von E14,5 bis P1,5 zwischen den drei Mäuse-Linien zu erkennen. Zum Zeitpunkt P15,5 konnten die mittels des 5-HT-Antikörpers gewonnen histochemischen Befunde durch die Immunhistochemie unter Anwendung eines TPH-Antikörpers bestätigt werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch eine Zählung der 5-HT positiven Zellen durchgeführt und kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zwischen den drei Linien gefunden. Dies spricht dafür, dass weder das Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors noch dessen Überexpression die Zahl der sich in der Raphe differenzierenden serotonergen Zellen beeinflusst.

Bezüglich der Entwicklung der serotonergen Projektionen in die jeweiligen Zielregionen haben wir folgende Beobachtungen gemacht. Zum Zeitpunkt E12,5 waren bereits serotonerge Projektionen in das mesencephale Tegmentum und in den Hypothalamus erkennbar, wobei die serotonergen Fasern in diesen Projektionsgebieten bei WT Mäusen dichter erschienen als bei KO und ÜE Mäusen (Abb.12). Zum Zeitpunkt E14,5 begann die serotonerge Innervierung im Septum, zum Zeitpunkt E16,5 waren erstmalig serotonerge Projektionen im Cortex sichtbar und erst zum Zeitpunkt E18,5 erreichte die serotonerge Innervierung den Hippocampus. Im Septum und Hippocampus entwickelte sich die serotonerge Innervierung sowohl bei KO Mäusen als auch bei ÜE Mäusen in gleichem Umfang wie bei WT Mäusen, während im Cortex die serotonerge Innervierung von E16,5 bis E18,5 bei WT Mäusen dichter als bei KO und ÜE Mäusen erschien. Diese Projektionsunterschiede im Cortex zwischen den drei Mäuse-Linien

waren von P1,5 an nicht mehr erkennbar. Diese Befunde weisen darauf hin, dass sowohl das Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors als auch dessen Überexpression zwar keinen Einfluss auf die Differenzierung der serotonergen Neurone hat, aber möglicherweise die anfängliche Entwicklung der Projektionen in das mesencephale Tegmentum, den Hypothalamus und den Cortex cerebri verzögert.

Die Entwicklung des serotonergen Systems wurde auch anhand der Konzentration seines Neurotransmitters und dessen Hauptmetaboliten verfolgt. Während der Entwicklungsperioden von E12,5 bis P1,5 nahmen bei allen drei Mäuse-Linien die Spiegel von 5-HT und 5-HIAA pro mg Gewebe im Gesamthirn kontinuierlich zu. Es traten jedoch bei den transgenen Tieren eine Reihe von signifikanten Unterschieden in der Höhe der Gewebsspiegel auf. Bei KO Mäusen beobachteten wir folgende Unterschiede der Gewebsspiegel von 5-HT und 5-HIAA im Vergleich zu WT Mäusen: von E12,5 bis E16,5 waren die Gewebsspiegel von 5-HT und 5-HIAA zwischen WT und KO Mäusen vergleichbar. Zum Zeitpunkt E18,5 waren nur die Gewebsspiegel von 5-HIAA bei KO Mäusen höher als bei WT Mäusen. Zum Zeitpunkt P1,5 waren sowohl 5-HT als auch 5-HIAA Spiegel bei KO Mäusen höher als bei WT Mäusen. Auch der Turnover von 5-HT war zu diesem Zeitpunkt erhöht. Zum Zeitpunkt P15,5 wurden die Gewebsspiegel von 5-HT und 5-HIAA in verschiedenen Zielregionen des serotonergen Systems gemessen. Im Hypothalamus und Striatum waren die beiden Gewebsspiegel bei KO Mäusen höher als bei WT Mäusen. Der Turnover von 5-HT war nur im Bulbus olfactorius erhöht. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit den Befunden bei adulten Tieren überein (Ase et al. 2000). Bei den adulten KO Mäusen wurden im Vergleich zu WT Tieren erhöhte 5-HT-Spiegel z.B. im Cortex cinguli und Rückenmark gefunden, erhöhte 5-HIAA-Spiegel in dem Bulbus olfactorius, dem Thalamus, der Raphe, der Substantia nigra und dem Locus coeruleus und ein erhöhter 5-HT Turnover in dem Bulbus olfactorius, der Substantia nigra und dem Locus coeruleus. Die Ursache der erhöhten Gewebsspiegel von 5-HT und 5-HIAA in verschiedenen Hirnregionen der KO Mäuse ist wahrscheinlich das Fehlen des 5-HT_{1A} Autorezeptors, und die daraus resultierende Enthemmung der serotonergen Neurone und Zunahme der tonischen Aktivität der serotonergen Neurone und des Turnovers von 5-HT in der Raphe und den serotonerg innervierten Regionen (Ase et al., 2000). Dementsprechend berichteten Richer et al. (2002), dass die Aktivität der serotonergen Neurone in der dorsalen Raphe bei KO Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen um etwa 90% erhöht war. In weiteren Studien wurden hingegen über normale Gewebsspiegel von 5-HT und 5-HIAA bei KO Mäusen berichtet (Ramboz et al., 1998; Heisler et al., 1998). Auch in *in vivo* Mikrodialyse-Studien wurden unterschiedliche Ergebnisse bei KO Mäusen gefunden. He et al.

(2001) zeigten, dass die basale extrazelluläre Konzentration von 5-HT bei KO Mäusen im Striatum unverändert war, während in einer anderen Studie eine Erhöhung der 5-HT-Spiegel im Dialysat im Frontalcortex und Hippocampus im Vergleich zu den WT Mäusen gemessen wurde (Parsons et al. 2001). Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass eine erhöhte serotonerge Aktivität bereits in der späten embryonalen und insbesondere frühpostnatalen Entwicklungsphase bei KO Mäusen besteht.

Bei ÜE Mäusen wurden folgende Unterschiede der Gewebsspiegel von 5-HT und 5-HIAA während den Entwicklungsperioden im Vergleich zu den WT Mäusen beobachtet: die Gewebsspiegel von 5-HT waren von E12,5 bis E14,5 zwischen ÜE und WT Mäusen vergleichbar und von E16,5 bis P1,5 bei ÜE Mäusen höher als bei WT Mäusen; die Gewebsspiegel von 5-HIAA waren von E12,5 bis E18,5 zwischen WT und ÜE Mäusen vergleichbar; zum Zeitpunkt P1,5 bestand jedoch eine massive Erhöhung des 5-HIAA-Spiegels und des 5-HT-Turnovers bei ÜE Mäusen. Zum Zeitpunkt P15,5 waren die Gewebsspiegel von 5-HT und 5-HIAA nur im Hypothalamus bei ÜE Mäusen höher als bei WT Mäusen, in allen anderen untersuchten Regionen jedoch mit den WT Mäusen vergleichbar. Die massive Erhöhung der serotonergen Aktivität in der frühpostnatalen Phase korreliert sehr gut mit der in der Rezeptorautoradiographie nachweisbaren transienten Erhöhung der Expression des 5-HT_{1A} Rezeptors. In der weiteren Entwicklung (P15,5) nimmt die Erhöhung der Rezeptorbindung ab und eine Erhöhung der 5-HT und 5-HIAA-Spiegel ist nur im Hypothalamus nachweisbar. Bei adulten ÜE Mäusen wurde von Kusserow et al. (2003) berichtet, dass die Gewebsspiegel von 5-HT im Vergleich zu WT Mäusen nicht nur wie bei P15,5 Mäusen im Hypothalamus, sondern auch im Striatum erhöht waren, im Gegensatz dazu war der 5-HT-Turnover im Hippocampus, Hypothalamus, parietalen Cortex und Striatum niedriger als bei WT Mäusen. Die Erhöhung des 5-HT-Spiegels und die Reduzierung des 5-HT-Turnovers im Vorderhirn sind mit einer Überexpression des 5-HT_{1A} Rezeptors in der Raphe der transgenen Linie vereinbar. Die Reduzierung des 5-HT-Turnovers bei ÜE Mäusen könnte teilweise auch mit einer erhöhten Aktivität des postsynaptischen 5-HT_{1A} Rezeptors zusammenhängen. Eine indirekt Regulation der serotonergen Neurontransmission durch postsynaptische 5-HT_{1A} Rezeptoren in den serotonergen innervierten Regionen wurde in einer Reihe von Studien demonstriert (Hamon et al., 1990; Ceci et al., 1994; Jolas et al., 1995; De Vry, 1995; Hamon, 1997; Barnes und Sharp, 1999; Hajos et al., 1999). Die bei einer Überexpression des 5-HT_{1A} Rezeptors zu erwartende Herabsetzung des 5-HT-Turnovers konnten wir in der postnatalen Phase jedoch nicht bestätigen. Zum Zeitpunkt P1,5 war der Turnover sogar erhöht und bei P15,5 Tieren unverändert. Dies

könnte dafür sprechen, dass in dieser Phase der Entwicklung andere Faktoren an der Regulation der Aktivität serotonerger Neurone und 5-HT-Freisetzung beteiligt sind.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnten wir weitere Hinweise dafür finden, dass die frühpostnatale Entwicklungsperiode eine kritische Zeit in der Entwicklung des serotonergen Systems darstellt. Die transiente Erhöhung der Expression des 5-HT_{1A} Rezeptors in der frühpostnatalen Periode assoziiert mit erhöhten 5-HT- und 5-HIAA-Spiegeln könnte einer der Faktoren sein, die das verringerte Angstverhalten in adulten Tieren auslösen (Kusserow et al., 2003). Diese Schlussfolgerung stimmt auch mit den von Gross et al. (2002) erhobenen Befunden bei KO Mäusen nach Wiederherstellung des 5-HT_{1A} Rezeptors in der frühpostnatalen Phase überein.

Paradoxerweise waren die Gewebsspiegel von 5-HT und 5-HIAA und der Turnover von 5-HT zu diesem Zeitpunkt sowohl bei ÜE Mäusen als auch bei KO Mäusen signifikant höher als bei WT Mäusen. Ein ähnlich paradoxes Phänomen wurde auch in einer pharmakologischen Studie an der Ratte beobachtet (Lauder et al., 2000). Sowohl die 5-HT-Entleerung des embryonalen Gehirns durch die Behandlung der trächtigen Ratte mit pCPA von E12 bis E17 als auch die erhöhte Stimulation der 5-HT Rezeptoren des embryonalen Gehirns mit dem nicht-selektiven 5-HT₁ / 5-HT₂ Rezeptoragonisten 5-Methoxytryptamin führten zur Reduzierung der Expression der 5-HT_{1A} Rezeptor mRNA im Gehirn der P4 Tiere. Dies bedeutet, dass sowohl eine erhöhte als auch eine erniedrigte serotonerge Aktivität während der pränatalen Entwicklung eine signifikante Reduzierung der Expression der 5-HT_{1A} Rezeptor mRNA in der postnatalen Periode zur Folge hat.

5.3 Entwicklung der catecholaminergen Systeme bei den drei Mäuse-Linien

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Entwicklung der catecholaminergen Systeme, die mit dem serotonergen System in engem Zusammenhang stehen, untersucht. Zum Zeitpunkt E12,5 waren die dopaminergen Neurone und Fasern in der Substantia nigra bei WT Mäusen immunhistochemisch weiter entwickelt dargestellt als bei KO und ÜE Mäusen. Ein ähnlicher, aber nicht signifikanter Trend bestand auch hinsichtlich des DA-Spiegels und der im Western Blot gemessenen TH-Proteinkonzentration. Dies deutet darauf hin, dass sich die dopaminergen Neurone und Fasern in der Substantia nigra in den frühen embryonalen Perioden wie zum Zeitpunkt E12,5 nicht nur bei Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors sondern auch bei dessen Überexpression langsamer als bei WT Mäusen entwickeln. Von E14,5 bis P15,5 war die weitere

Entwicklung der dopaminergen Neurone und Fasern nicht nur in der Substantia nigra und im ventralen Tegmentum, sondern auch im Bulbus olfactorius zwischen den drei Mäuse-Linien vergleichbar. Auch bei adulten KO Mäusen wurde mittels TH-Immunhistochemie gezeigt, dass die Verteilung der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra und im ventralen Tegmentum der Verteilung bei den adulten WT Mäusen entspricht (Heisler et al., 1998).

In der vorliegenden Untersuchung waren die DA-Spiegel in den embryonalen und frühpostnatalen Perioden (E12,5-P1,5) zwischen WT und KO Mäusen vergleichbar. Dies deutet vielleicht darauf hin, dass die DA Synthese und / oder Freisetzung während dieser Entwicklungsperioden bei Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors unverändert ist. Zum Zeitpunkt P15,5 hingegen waren die DA-Spiegel im Striatum bei KO Mäusen höher als bei WT Mäusen, während in den weiteren untersuchten Subregionen des Gehirns keine Unterschiede der DA-Spiegel gefunden wurden. Die Erhöhung des DA-Spiegels im Striatum der KO Mäuse war jedoch nicht mit einer Erhöhung des Metaboliten DOPAC assoziiert. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit der bei adulten KO Mäusen beschriebenen Erhöhung des DA-Spiegels bei unveränderter DOPAC-Konzentration im Striatum überein (Ase et al., 2000). Die von Ase und Mitarbeitern bei adulten KO Mäusen beschriebene Verminderung des DA-Spiegels im Hypothalamus oder Erhöhung des DOPAC-Spiegels im Bulbus olfactorius waren zum Zeitpunkt P15,5 noch nicht nachweisbar. Der Grund für die Erhöhung von DA oder seines Metaboliten wurde von Ase und Mitarbeitern (2000) dahingehend diskutiert, dass die erhöhte Aktivität der serotonergen Neurone im Hirnstamm bei KO Mäusen zur Förderung der Enthemmung der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra führen und daraus die Erhöhung von DA im Striatum sowie seinem Metabolit DOPAC in anderen dopaminergen innervierten Hirnregionen wie Bulbus olfactorius oder Substantia nigra resultieren kann. Die fehlenden dopaminergen Veränderungen im Hypothalamus und Bulbus olfactorius bei den P15,5 KO Mäusen zeigen, dass sich die Enthemmung dopaminerger Neurone teilweise erst im späteren Verlauf der Entwicklung des Gehirns einstellt. Andererseits konnte in einer Mikrodialyse-Studie demonstriert werden, dass sowohl die basale als auch die KCl-stimulierte Freisetzung von DA im dorsalen Striatum bei KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen nicht verändert waren (He et al., 2001).

Bei ÜE Mäusen waren die DA-Spiegel während den Entwicklungsperioden von E12,5 bis P15,5 nur zum Zeitpunkt P1,5 höher als bei WT Mäusen. Dies entspricht dem Zeitpunkt, an dem in der Autoradiographie erhöhte 5-HT_{1A} Rezeptorbindung und auch erhöhte Spiegel von 5-HT und 5-HIAA gefunden wurden. Ein Zusammenhang zwischen erhöhter Aktivierung des 5-HT_{1A}

Rezeptors und dopaminerger Aktivität ist bereits aus pharmakologischen Untersuchungen an der adulten Ratte bekannt. Es wurde in *in vivo* Studien wiederholt gezeigt, dass durch die Behandlung mit 5-HT oder Agonisten des 5-HT_{1A} Rezeptors die basale Freisetzung von DA in unterschiedlichen Hirnregionen wie im Frontalcortex (Tanda et al., 1994; Iyer und Bradberry, 1996; Gobert et al. 1998) und im Striatum (Benloucif und Galloway, 1991; Benloucif et al., 1993) erhöht war. Eine elektrophysiologische Studie an der Ratte zeigte *in vivo*, dass die Aktivität dopaminerger Zellen im ventralen Tegmentum durch die Agonisten des 5-HT_{1A} Rezeptors wie 8-OH-DPAT erhöht wurde (Prisco et al., 1994). Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung des 5-HT_{1A} Rezeptors die Enthemmung der dopaminergen Bahnen und Erhöhung der Aktivität der dopaminergen Neurone im ventralen Tegmentum und der Freisetzung von DA im Frontalcortex zur Folge hat (Prisco et al., 1994; Gobert et al., 1998).

Eine ausgeprägte Interaktion besteht auch zwischen den serotonergen und noradrenergen Systemen (Mongeau et al., 1997). So reduziert z.B. eine langfristige Behandlung (21 Tage) mit den selektiven 5-HT Wiederaufnahme-Hemmstoffen (Paroxetin) die Aktivität der noradrenergen Neurone im LC (Szabo et al., 1999; 2000). Andererseits reguliert auch die langfristige Behandlung mit selektiven NA Wiederaufnahme-Hemmstoffen wie Desipramin, Nisoxetin und Reboxetin die Funktion des serotonergen Systems und führt zur Erhöhung der extrazellulären 5-HT Konzentration und Ansprechbarkeit des 5-HT_{1A} Rezeptors in den postsynaptischen Strukturen (Szabo und Blier, 2001; Yoshioka et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit waren von E12,5 bis P15,5 bei Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors sowohl die Immunreaktivität der noradrenergen Neurone im LC als auch die NA-Spiegel im Gesamthirn (E12,5-P1,5) oder in den untersuchten Subregionen (P15,5) mit denen der WT Mäuse vergleichbar. Diese Ergebnisse stimmen mit den Studien an adulten Tieren überein. Auch bei adulten Mäusen wurde mittels TH-Immunhistochemie nachgewiesen, dass die Immunreaktivität der noradrenergen Neurone im LC bei Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors der bei WT Mäusen entsprach (Heisler et al., 1998). Bezüglich der NA-Spiegel wurden auch keine wesentlichen Unterschiede zwischen adulten KO und WT Mäusen gefunden (Ramboz et al., 1998). Ase und Mitarbeiter (2000) berichteten, dass die NA-Spiegel bei Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors in verschiedenen corticalen Regionen, in dem Hippocampus, Hypothalamus und LC unverändert, und nur in dem Bulbus olfactorius, Thalamus, der Substantia nigra und dem Cerebellum im Vergleich zu WT Mäusen erhöht waren. Eine elektrophysiologische Studie zeigte auch, dass das Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors bei KO Mäusen zwar zur signifikanten Erhöhung der Aktivität der serotonergen Neurone führte, aber die

Freisetzung von 5-HT oder NA in den untersuchten Hirnregionen wie im Frontalcortex, Hippocampus und in der Raphe unverändert blieb (Richer et al., 2002). Unsere Befunde bezüglich des noradrenergen Systems während der verschiedenen Entwicklungsphasen als auch die Ergebnisse bei den adulten Mäusen zeigen, dass das Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors keine wesentlichen Konsequenzen für die Entwicklung und Erhaltung des noradrenergen Systems im ZNS hat. Es könnte daher sein, dass der 5-HT_{1A} Rezeptor keine kritische Rolle in der Interaktion beider monoaminerger Systeme spielt oder der Verlust des 5-HT_{1A} Rezeptors über andere 5-HT Rezeptoren kompensiert werden kann.

Bei ÜE Mäusen beobachteten wir bezüglich des noradrenergen Systems eine signifikante Erhöhung des NA-Spiegels im Gesamthirn zum Zeitpunkt P1,5 und im Hypothalamus zum Zeitpunkt P15,5. Die höheren NA-Spiegel korrelierten auch mit einer stärkeren Immunreaktivität der noradrenergen Neurone und Fasern im LC als bei WT und KO Mäusen zum Zeitpunkt P15,5. Interessanterweise war die Erhöhung des NA-Spiegels im Hypothalamus auch bei adulten ÜE Tieren nachweisbar (Hörtnagl, unveröffentlichte Ergebnisse). Auch in pharmakologischen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Aktivierung des 5-HT_{1A} Rezeptors und Aktivität noradrenerger Neurone bewiesen werden. An der adulten Ratte wurde in Mikrodialyse-Studien gezeigt, dass Agonisten des 5-HT_{1A} Rezeptors, wie 8-OH-DPAT, eine Zunahme des extrazellulären NA in verschiedenen Hirnregionen des Vorderhirns wie im Frontalcortex (Gobert et al., 1998), im Hippocampus (Done CJ und Sharp T, 1994; Hajós-Korcsok und Sharp, 1996), im Hypothalamus (Suzuki et al., 1995), und im ventralen Tegmentum (Chen und Reith, 1995) zur Folge haben. Auch mittels Fos-ähnlicher Immunreaktivität, ein Marker der neuronalen Aktivität haben Hajós-Korcsok und Sharp (1999b) einen immunzytochemischen Nachweis erbracht, dass Agonisten des 5-HT_{1A} Rezeptors zur Aktivierung der noradrenergen Neurone im LC und Erhöhung der noradrenergen Neurotransmission in den postsynaptischen Regionen des Vorderhirns wie Frontalcortex führen können. Diese Effekte wurden durch die Vorbehandlung mit Antagonisten des 5-HT_{1A} Rezeptors wie WAY 1000635 blockiert. Zusammenfassend könnten die von uns erhobenen Ergebnisse und die oben angeführten Befunde dahingehend interpretiert werden, dass eine Überexpression / Aktivierung des 5-HT_{1A} Rezeptors zur Reduzierung der Aktivität der serotonergen Neurone, und zur daraus resultierenden Enthemmung der noradrenergen Neurone im LC, zu einer Erhöhung der NA-Synthese und letztlich zur Erhöhung der Freisetzung von NA in die Synapse in den Projektionsgebieten führen kann.

5.4 Korrelation zwischen dem serotonergen System und S100β

Hinsichtlich des neurotrophen Faktors, S100β Protein, konnten wir Hinweise dafür finden, dass bei einer Überexpression des 5-HT_{1A} Rezeptors die Zahl der S100β-immunreaktiven Zellen im Hippocampus und Striatum zunimmt. Der Zusammenhang zwischen dem serotonergen System und S-100β wird auch durch andere Untersuchungen bestätigt. In primären Astrogliazellkulturen der Ratte wurde gezeigt, dass die Stimulierung von 5-HT_{1A} Rezeptoren zur Reifung der Morphologie der Astrozyten und Freisetzung von S100β führen kann (Whitaker-Azmitia et al., 1990). In der primären Zellkultur der Raphe der Ratte wurde demonstriert, dass S100β, nicht aber Nervenwachstumsfaktor, Epidermiswachstumsfaktor, Insulin, oder Calmodulin das Wachstum des serotonergen Systems regulieren und die Verlängerung von Neuriten fördern können (Liu und Lauder, 1992; Azmitia et al., 1990; Muller et al., 1993; Nishi et al., 2000). Bei der adulten Ratte führt die Hemmung der 5-HT-Synthese zur Reduzierung von S100β (Azmitia et al., 1995; Haring et al., 1993) und die Behandlung mit Agonisten des 5-HT_{1A} Rezeptors zur Zunahme von S100β (Azmitia et al., 1995). Darüber hinaus zeigte die Studie an Polydactylie-mutanten Mäusen (Polydactyly Nagoya), die neben verschiedenen Anomalien des Gehirns auch eine verzögerte Produktion von S100β aufweisen, dass die Spiegel von 5-HT und 5-HIAA in verschiedenen Hirnregionen wie im Cortex und Hippocampus bei den mutanten Mäusen niedriger waren als bei Wild-Typ-Mäusen (Ueda et al., 1994). Hingegen kann die Transplantation der C6 Glioma Zelllinie, die S100β enthält und auch S100β in den extrazellulären Raum freisetzt (Van Eldik und Zimmer, 1987), in den Hippocampus der adulten Ratte den Auswuchs von serotonergen Fasern begünstigen (Ueda et al., 1995). Dies würde die Hypothese unterstützen, dass S100β die Funktion eines serotonergen Wachstumsfaktors während der Entwicklung hat und dessen Erhöhung das Wachstum der serotonergen Terminale sogar bei adulten Tiere stimulieren kann. Der kürzlich veröffentlichte Befund der normalen Entwicklung des serotonergen Systems im Gehirn bei S100β knockout Mäusen zeigt aber, dass S100β kein essentieller Faktor für die Entwicklung des serotonergen Systems ist oder seine Funktion durch andere Wachstumsfaktoren kompensiert werden kann (Nishiyama et al. 2002). Auch bei Mäusen mit S100β Überexpression mit 2-3fach höheren Spiegeln der S100β mRNA im Gehirn sind keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der 5-HT Spiegel im Vorderhirn und der immunhistochemischen Verteilung der serotonergen Fasern zu erkennen. Die Überexpression

von S100 β führt außerdem nicht zum Schutz serotonerger Neurone vor der selektiven Neurotoxizität von 5,7-DHT (Bendotti et al., 2002).

5.5 Einfluss des 5-HT_{1A} Rezeptors auf die Synaptogenese und Myelinisierung

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Western Blot untersucht, ob die synaptischen Vesikelpoteine wie Synaptobrevin, Synaptophysin, Synaptotagmin und SNAP-25 bei den drei Mäuse-Linien unterschiedliche Entwicklungsprofile zeigen. Zum Zeitpunkt E12,5 war mittels Western Blot-Analyse bei WT Mäusen eine höhere Konzentration von Synaptobrevin und Synaptotagmin nachweisbar als bei KO und ÜE Mäusen. SNAP-25 war nur bei ÜE Mäusen niedriger als bei WT Mäusen. Von E14,5 bis P15,5 waren keine Unterschiede von Synaptobrevin und Synaptophysin bei den drei Mäuse-Linien erkennbar. Das Fehlen der Detektion von Synaptophysin bei den drei Mäuse-Linien in der frühen pränatalen Periode (E12,5) könnte dahingehend erklärt werden, dass sich Synaptophysin unabhängig davon, ob der 5-HT_{1A} Rezeptor nicht, normal oder vermehrt expremiert wird, langsamer als die anderen untersuchten synaptischen Proteine entwickelt oder die Empfindlichkeit der Western Blot-Analyse nicht ausreichend war. Hingegen sprechen unsere Befunde dafür, dass sowohl bei Überexpression des 5-HT_{1A} Rezeptors als auch bei dessen Fehlen die Expression von Synaptobrevin und Synaptotagmin im Gehirn der frühen embryonalen Periode im Vergleich zu normaler 5-HT_{1A} Rezeptor-Expression verzögert wird. Für eine Beeinflussung der Expression von synaptischen Proteinen durch 5-HT sprechen auch die von Whitaker-Azmitia (2001) beschriebenen Ergebnisse, dass die Hemmung der 5-HT-Synthese bei Ratten während der postnatalen Periode P10 bis P20 den Verlust von Synapsen zur Folge hat, wie dies mittels immunhistochemischer Färbung mit Synaptophysin oder SNAP 25 gezeigt wurde.

Die Myelinisierung wird als einer der morphologischen Hinweise zur Beobachtung der Entwicklung und Reifung des ZNS angesehen und ist ein biologischer Vorgang, bei dem die Oligodendrozyten ihre plasmatischen Membranen verlängern, die Axone umhüllt werden und Myelin gebildet wird. Aus früheren Untersuchungen geht hervor, dass 5-HT bei der axonalen Myelinisierung eine Rolle spielt (siehe Übersicht Whitaker-Azmitia, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde der Grad der Myelinisierung anhand des Myelin-assoziierten Proteins MBP mittels immunhistochemischer Methode und Western Blot-Analyse zum Zeitpunkt P15,5 untersucht, um festzustellen, ob das Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors oder die Überexpression des 5-HT_{1A} Rezeptors den Vorgang der Myelinisierung beeinflussen kann. MBP positive Fasern wurden im

frontalen Cortex, Hippocampus und Septum intensiv gefärbt, es waren aber keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Mäuse-Linien zu erkennen. Dies wurde auch durch Western Blot-Analyse bestätigt. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass der 5-HT_{1A} Rezeptor keine essentielle Rolle bei der Myelinisierung spielt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Sensitivität der verwendeten Methoden nicht ausreichend war, um geringfügige Veränderung zu erfassen. Das Fehlen des Nachweises von MBP bei P1,5 Mäusen mittels immunhistochemischer Methode und der Western Blot-Analyse stimmt mit dem Befund von Hamano und Mitarbeiter (1996) im Gehirn der Ratte überein, dass die Myelinisierung verschiedener Nervenbahnen erst während der ersten postnatalen Woche oder später beginnt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Gehirne von 5-HT_{1A} Rezeptor KO, ÜE und WT Mäusen während der embryonalen und frühpostnatalen Entwicklung (E12,5 bis P15,5) untersucht, um weitere Informationen über den Einfluss des 5-HT_{1A} Rezeptors auf die Entwicklung und Funktion des serotonergen Systems und der catecholaminergen Systeme im Gehirn zu erhalten. Bei KO Mäusen (P15,5) waren keine Bindungssignale des 5-HT_{1A} Rezeptors in der Raphe, im cerebralen Cortex, Hippocampus und Septum erkennbar. Bei ÜE Mäusen bestand eine transiente Überexpression des 5-HT_{1A} Rezeptors nur in der frühpostnatalen Periode (P1,5) im Septum, Hippocampus und Cortex.

Die generelle Entwicklung des Gehirns einschließlich dessen histologischen Architektur wurde von E12,5 bis P15,5 durch die transgenen Veränderungen am 5-HT_{1A} Rezeptor nicht wesentlich beeinflusst. Sowohl das Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors als auch dessen Überexpression hatten keinen Einfluss auf die Differenzierung der serotonergen Neurone, verzögerte aber die erste Entwicklung der serotonergen Innervierungen im mesencephalen Tegmentum, Hypothalamus und cerebralen Cortex. In den späten embryonalen und insbesondere frühpostnatalen Perioden waren die 5-HT- und 5-HIAA-Spiegel nicht nur bei KO Mäusen, sondern auch bei ÜE Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen signifikant erhöht. Eine Erhöhung des 5-HT Turnovers wurde erst in der frühpostnatalen Periode beobachtet. Zum Zeitpunkt P15,5 waren die 5-HT- und 5-HIAA-Spiegel im Hypothalamus bei KO und ÜE Mäusen und im Striatum nur bei KO Mäusen höher als bei WT Mäusen, während der Turnover von 5-HT nur bei KO Mäusen im Bulbus olfactorius höher als bei WT und ÜE Mäusen war. Dies spricht dafür, dass sowohl das Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors als auch dessen Überexpression zu einer Erhöhung der Synthese von 5-HT und/oder der Aktivität des serotonergen Systems führt.

Im Vergleich zu WT Mäusen verzögerte sich die Entwicklung der dopaminergen Neurone und Fasern sowohl bei KO Mäusen als auch bei ÜE Mäusen nur in der frühen embryonalen Periode (E12,5). Zu diesem Zeitpunkt bestand auch ein ähnlicher, aber nicht signifikanter Trend bezüglich des DA-Spiegels und der im Western Blot nachgewiesenen TH-Proteinexpression. Zum Zeitpunkt P1,5 waren die DA-Konzentrationen in den Gehirnen der ÜE Mäusen höher als bei denen der WT Mäuse. Dies entspricht dem Zeitpunkt, an dem in der Autoradiographie erhöhte 5-HT_{1A} Rezeptorbindung und auch erhöhte Spiegel von 5-HT und 5-HIAA gefunden wurden. Zum Zeitpunkt P15,5 hingegen waren die DA-Spiegel nur im Striatum bei KO Mäusen höher als bei WT Mäusen, jedoch nicht assoziiert mit einer Erhöhung des Metaboliten DOPAC.

Darüber hinaus bestand bei der Überexpression des 5-HT_{1A} Rezeptors im Vergleich zu WT Mäusen eine signifikante Erhöhung des NA-Spiegels in Gesamthirn zum Zeitpunkt P1,5 und im Hypothalamus zum Zeitpunkt P15,5. Die höheren NA-Spiegel korrelierten auch mit einer stärkeren Immunreaktivität der noradrenergen Neurone und Fasern im LC als bei WT Mäusen zum Zeitpunkt P15,5. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die Überexpression des 5-HT_{1A} Rezeptors möglicherweise die postnatale Entwicklung der noradrenergen Neurone im LC begünstigt.

Die Expression der synaptischen Proteine Synatobrevin und Synatotagmin war sowohl bei Fehlen des 5-HT_{1A} Rezeptors als auch bei dessen Überexpression im Vergleich zu WT Mäusen in der frühen embryonalen Periode (E12) verzögert. Dies könnte mit der verzögerten Entwicklung der serotonergen Projektionen und des dopaminergen Systems in Zusammenhang stehen.

Bezüglich des für das serotonerge System neurotroph wirksame Proteins S100β konnten wir Hinweise finden, dass die Zahl der S100β-immunreaktiven Zellen bei ÜE Mäusen im Hippocampus und Striatum zunahm. Dieser Befund würde einer Überaktivität von 5-HT_{1A} Rezeptoren entsprechen.

Die Myelinisierung im Gehirn, gemessen an Expression von MBP, wurde durch die transgenen Veränderungen am 5-HT_{1A} Rezeptor nicht wesentlich beeinflusst.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aghajanian GK, Sprouse JS, Sheldon P, Rasmussen K (1990). Electrophysiology of the central serotonin system: receptor subtypes and transducer mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 600:93-103
- Allen AR, Singh A, Zhuang ZP, Kung MP, Kung HF, Lucki I (1997). The 5-HT_{1A} receptor antagonist p-MPPI blocks responses mediated by postsynaptic and presynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57:301-307
- Anderson CD, Pasquier DA, Forbes WB, Morgane PJ (1977). Locus coeruleus-to-dorsal raphe input examined by electrophysiological and morphological methods. *Brain Res. Bull.* 2: 209-221
- Apter JT, Allen LA (1999). Buspirone: future directions. *J. Clin. Psychopharmacol.* 19:86-93
- Ase AR, Reader TA, Hen R, Riad M, Descarries L (2000). Altered serotonin and dopamine metabolism in the CNS of serotonin 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptor knockout mice. *J. Neurochem.* 75:2415-2426
- Assie MB, Koek W (1996). Effects of 5-HT_{1A} receptor antagonists on hippocampal 5-hydroxytryptamine levels: (S)-WAY100135, but not WAY100635, has partial agonist properties. *Eur. J. Pharmacol.* 304:15-21
- Azmitia EC, Dolan K, Whitaker-Azmitia PM (1990). S-100 β but not NGF, EGF, insulin or calmodulin is a CNS serotonergic growth factor. *Brain Res.* 516:354-356
- Azmitia EC (2001). Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.* 56:413-424
- Azmitia EC, Rubinstein VJ, Strafaci JA, Rios JC, Whitaker-Azmitia PM (1995). 5-HT_{1A} agonist and dexamethasone reversal of para-chloroamphetamine induced loss of MAP-2 and synaptophysin immunoreactivity in adult rat brain. *Brain Res.* 677:181-192
- Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM, Kheck N, Gannon P (1996). The cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate cortex, hippocampus and brainstem neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology* 14:35-46

- Azmitia PM, Murphy R Azmitia EC (1990). Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res.* 528:155-158
- Baraban JM, Aghajanian GK (1980). Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. *Neuropharmacology.* 19: 355-363
- Baraban JM, Aghajanian GK (1981). Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: demonstration by electron microscopic autoradiography. *Brain Res.* 204:1-11
- Barnes NM, Sharp T (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152
- Bendotti C, Cole SE, Gobbi M, Hohmann C, Reeves RH (2002). Overexpression of S100beta in transgenic mice does not protect from serotonergic denervation induced by 5,7-dihydroxytryptamine. *J. Neurosci. Res.* 67:501-510
- Benloucif S, Keegan MJ, Galloway MP (1993). Serotonin-facilitated dopamine release in vivo: pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265:373-377
- Benloucif S, Galloway MP (1991). Facilitation of dopamine release in vivo by serotonin agonists: studies with microdialysis. *Eur. J. Pharmacol.* 200:1-8
- Bhattacharyya A, Oppenheim RW, Prevette D, Moore BW, Brackenbury R, Ratner N (1992). S100 is present in developing chicken neurons and Schwann cells and promotes motor neuron survival in vivo. *J. Neurobiol.* 23:451-466
- Blier P, de Montigny C (1987). Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain. *Synapse* 1:470-480
- Borella A, Bindra M, Whitaker-Azmitia PM (1997). Role of the 5-HT_{1A} receptor in development of the neonatal rat brain: preliminary behavioral studies. *Neuropharmacology* 36:445-450
- Briner K, Dodel RC (1998). New approaches to rapid onset antidepressants. *Curr. Pharm. Res.* 4:291-302
- Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell T M, Rubenstein JLR, Ericson J (1999). Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398: 622 - 627

- Ceci A, Baschiroto A, Borsini F (1994). The inhibitory effect of 8-OH-DPAT on the firing activity of dorsal raphe serotonergic neurons in rats is attenuated by lesion of the frontal cortex. *Neuropharmacology* 33:709-713
- Chen N-H, Reith MEA (1995). Monoamine interactions measured by microdialysis in the ventral tegmental area of rats treated systemically with (\pm)-8-hydroxy-2-(di-npropylamino) tetralin. *J. Neurochem.* 64:1585-97
- Dahlström A, Fuxe K (1964): Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62, Suppl 232:1-55
- Daval G, Verge D, Becerril A, Gozlan H, Sampinato U, Hamon M (1987). Transient expression of 5-HT_{1A} receptor binding sites in some areas of the rat CNS during postnatal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 5:171-180
- De Deurwaerdere P, L'hirondel M, Bonhomme N, Lucas G, Cheramy A, Spampinato U (1997). Serotonin stimulation of 5-HT₄ receptors indirectly enhances in vivo dopamine release in the rat striatum. *J. Neurochem.* 68:195-203
- De Vry (1995). 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology* 121:1-26
- Di Porzio U, Zuddas A, Cosenza-Murphy DB, Barker JL (1990). Early appearance of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells in the mesencephalon of mouse embryos. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8:523-532
- Done CJ, Sharp T (1994). Biochemical evidence for the regulation of central noradrenergic activity by 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors. microdialysis studies in the awake and anaesthetized rat. *Neuropharmacology* 33:411-421
- Ferron A, Descarries L, Reader TA (1982). Altered neuronal responsiveness to biogenic amines in rat cerebral cortex after serotonin denervation or depletion. *Brain Res.* 231:93-108
- Galter D, Unsicker K (2000). Sequential activation of the 5-HT_{1A} serotonin receptor and Trk B induces the serotonergic neuronal phenotype. *Mol. Cell. Neurosci.* 15:446-455
- Gingrich JA, Hen R (2000). Commentary: The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10:146-152

- Gingrich JA, Hen R (2001). Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. *Psychopharmacology* 155:1-10
- Glowinski J, Iversen LL (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [³H]norepinephrine, [³H]dopamine and [³H]dopa in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13:655-669
- Gobert A, Rivet J-M, Audinot V, Newman-Tancerdi A, Cistarelli L, Millan MJ (1998). Simultaneous quantification of serotonin, dopamin, and noradrenalin levels in single frontal cortex dialysates of freely-moving rats reveals a complex pattern of reciprocal auto- and heteroreceptor-mediated control of release. *Neuroscience* 84:413-429
- Goridis C, Rohrer H (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:531-541
- Gozlan H, Thibault S, Laporte AM, Lima L, Hamon M (1995). The selective 5-HT_{1A} antagonist radioligand [3H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT_{1A} receptors in rat brain membranes. *Eur. J. Pharmacol.* 288:173-186
- Gross C, Santarelli L, Brunner D, Zhuang XX, Hen R (2000). Altered fear circuits in 5-HT_{1A} receptor KO mice. *Biol. Psychiatry* 48:1157-1163
- Gross C, Zhuang XX, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, Santarelli L, Beck S, Hen R (2002). Serotonin_{1A} receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416:396-400
- Haddjeri N, de Montigny C, Blier P (1997). Modulation of the firing activity of noradrenergic neurons in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. *Br. J. Pharmacol.* 120: 865-875
- Hajós-Korcsok É, Sharp T (1996). 8-OH-DPAT-induced release of hippocampal noradrenaline in vivo: evidence for a role of both 5-HT_{1A} and dopamine D1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 314:285-291
- Hajós M, Hajós -Korcsok E, Sharp T (1999a). Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 126:1741-1750

- Hajós-Korcsok É, Sharp T (1999b). Effect of 5-HT_{1A} receptor ligands on Fos-like immunoreactivity in rat brain: evidence for activation of noradrenergic transmission. *Synapse* 34:145-153
- Hamano K, Iwasaki N, Takeya T, Takita H (1996). A quantitative analysis of rat central nervous system myelinsation using the immunohistochemical method for MBP. *Dev. Brain Res.* 93:18-22
- Hamon M (1997). The Main Features of Central 5-HT_{1A} Receptors., Göthert M (Eds.). Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS, Springer -Verlag, Berlin, Germany, S.238-268
- Handley SL (1995). 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol. Ther.* 66:103-48
- Haring JH, Hagan A, Olson J, Rodgers B (1993). Hippocampal serotonin levels influence the expression of S100 beta detected by immunocytochemistry. *Brain Res.* 631:119-123
- He M, Sibille E, Benjamin D, Toth M, Shippenberg T (2001). Differential effects of 5-HT_{1A} receptor deletion upon basal and fluoxetine-evoked 5-HT concentrations as revealed by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 902: 11-17
- Heisler LK, Chu H-M, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH (1998). Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15049-15054
- Herregodts P, Velkeniers B, Ebinger G, Michotte Y, Vanhaelst L, Hooghe-Peters E (1990). Development of monoaminergic neurotransmitters in fetal and postnatal rat brain: analysis by HPLC with elektrochemical detection. *J. Neurochem.* 55:774-779
- Hery F, Boulenguez P, Semont A, Hery M, Pesce G, Becquet D, Faudon M, Deprez P, Fache M-P (1999). Identification and role of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in primary cultures of rat embryonic rostral raphe nucleus neurons. *J. Neurochem.* 72:1791-1801
- Hillion J, Catelon J, Raid M, Hamon M, De Vitry F (1994). Neuronal localization of 5-HT_{1A} receptor mRNA and protein in rat embryonic brain stem cultures. *Dev. Brain Res.* 79: 195-202

- Hjorth S, Sharp T (1991). Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis. *Life Sci.* 48:1779-1786
- Hoyer D, Martin GR (1996). Classification and nomenclature of 5-HT receptors: a comment on current issues. *Behav. Brain Res.* 73:263-268
- Hynes M, Rosenthal A (1999). Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9:26-36
- Isobe T, Okuyama T (1981). The amino acid sequence of the tryptophan-containing subunit (alpha-subunit) of bovine brain S-100 protein. *J. Neurochem.* 37:522-524
- Iyer RN, Bradberry CW (1996). Serotonin-mediated increase in prefrontal cortex dopamine release: pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 40-47
- Jacobowitz DM, Abbott LC (1997). Chemoarchitectonic atlas of the developing mouse brain. CRC Press, Boca Raton, USA
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 72:165-229
- Jolas T, Schreiber R, Laporte AM, Chastanet M, De Vry J, Glaser T, Adrien J, Hamon M (1995). Are postsynaptic 5-HT_{1A} receptors involved in the anxiolytic effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and in their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272: 920-929
- Kennett GA, Marcou M, Dourish CT, Curzon G (1987). Single administration of 5-HT_{1A} agonists decreases 5-HT_{1A} presynaptic, but not postsynaptic receptor-mediated responses: relationship to antidepressant-like action. *Eur. J. Pharmacol.* 138:53-60
- Kia HK, Brisorgueil MJ, Hamon M, Calas A, Verge D (1996a). Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in the rat brain. *J. Neurosci. Res. Dec.* 46:697-708
- Kia HK, Miquel M-C, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, El Mestikawy S, Hamon M, Verge D (1996b). Immunocytochemical Localization of Serotonin_{1A} Receptors in the Rat Central Nervous System. *J. Comp. Neurol.* 365:289-305
- Kligman D, Marshak DR (1985). Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7136-7139

- Kligman D, Hilt DC (1988). The S100 protein family. *Trends Biochem. Sci.* 13:437-43
- Knobelman DA, Hen R, Blendy JA, Lucki I (2001b). Regional patterns of compensation following genetic deletion of either 5-Hydroxytryptamine_{1A} or 5-Hydroxytryptamine_{1B} receptor in the Mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298:1092-1100
- Knobelman DA, Hen R, Lucki I (2001a). Genetic regulation of extracellular Serotonin by 5-Hydroxytryptamin_{1A} and 5- Hydroxytryptamin _{1B} autoreceptors in different brain regions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298:1083-1091
- Knobelman DA, Kung HF, Lucki I (2000). Regulation of extracellular concentrations of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in mouse striatum by 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292:1111-1117
- Kreiss DS, Lucki I (1994). Differential regulation of serotonin (5-HT) release in the striatum and hippocampus by 5-HT_{1A} Autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290:1268-1279
- Kusserow H, Davies B, Hörtnagl H, Voigt I, Stroh T, Bert B, Deng DR, Fink H, Veh RW, Theuring F (2003). Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin _{1A} receptors. *Neuroscience.* (zur Publikation eingereicht)
- Lauder JM (1990). Ontogeny of the Serotonergic System in the Rat: Serotonin as a Developmental Signal. *Ann. N.Y.Acad Sci.* 600:297-313
- Lauder JM, Liu J, Grayson DR (2000). In utero exposure to serotonergic drugs alters neonatal expression of 5-HT _{1A} receptor transcripts: a quantitative RT-PCR study. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18:171-176
- Lavdas AA, Blue ME, Lincoln J, Parnavelas JG (1997). Serotonin promotes the differentiation of glutamate neurons in organotypic slice cultures of the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 17:7872-80
- Leger L, Descarries L (1978). Serotonin nerve terminals in the locus coeruleus of adult rat: a radioautographic study. *Brain Res.* 145:1-13
- Lauder JM, Bloom FE (1974). Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J. Comp. Neurol.* 155:469-482
- Lauder JM, Krebs H (1978). Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev. Neurosci.* 1:15-30

- Lauder JM, Wallace JA, Krebs H, Petrusz P, McCarthy K (1982). In viro and in vitro development of serotonergic neurons. *Brain Res. Bull.* 9:605-625
- Lauder JM, Wallace JA, Wilkie MB, DiNome A, Krebs H (1983). Roles for serotonin in neurogenesis. *Monogr. Neural Sci.* 9:3-10.
- Lidov HGW, Molliver ME (1982a). Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Res. Bull.* 9:559-604
- Lidov HGW, Molliver ME (1982b). An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res. Bull.* 8: 389-430
- Liu J, Lauder JM (1992). Serotonin promotes region-specific glial influences on cultured serotonin and dopamine neurons. *Glia* 5:306-317
- Lucas JJ, Hen R (1995). New players in the 5-HT receptor field: genes and knockouts. *Trends Pharmacol. Sci.* 16:246-252
- Lucki I, Singh A, Kreiss DS (1994). Antidepressant-like behavioral effects of serotonin receptor agonists. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18:85-95
- Marshak DR (1990). S100 beta as a neurotrophic factor. *Prog. Brain Res.* 86:169-181
- McRae-Degueurce A, Berod A, Mermet A, Keller A, Chouvet G, Joh TH, Pujol JF (1982). Alterations in tyrosine hydroxylase activity elicited by raphe nuclei lesions in the rat locus coeruleus: evidence for the involvement of serotonin afferents. *Brain Res.* 235:285-301
- Miquel MC, Doucet E, Riad M, Adrien J, Verge D, Hamon M (1992). Effect of the selective lesion of serotonergic neurons on the regional distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA in the rat brain. *Mol. Brain Res.* 14: 357-362
- Molliver ME (1987). Serotonergic neuronal systems: What their anatomic organization tells us about function. *J. Clin. Psychopharmacol.* 7:3-23
- Mongeau R, Blier P, de Montigny C (1997). The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res. Rev.* 23:145-195
- Moore BW (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19:739-44

- Muller CM, Akhavan AC, Bette M (1993). Possible role of S-100 in glia-neuronal signalling involved in activity-dependent plasticity in the developing mammalian cortex. *J. Chem. Neuroanat.* 6:215-227
- Murphy DL, Wichems C, Li Q, Heils A (1999). Molecular manipulations as tools for enhancing our understanding of 5-HT neurotransmission. *Trends Pharmacol. Sci.* 20:246-252
- Nishi M, Kawata M, Azmitia EC (2000). Trophic interactions between brain - derived neurotrophic factor and S100 β on culture serotonergic neurons. *Brain Res.* 868:113-118
- Nishiyama N, Takemura M, Takeda T, Itohara S (2002). Normal development of serotonergic neurons in mice lacking S100 β . *Neurosci. Lett.* 321:49-52
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin $1A$ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10734-10739
- Parsons LH, Kerr TM, Tecott LH (2001). 5-HT $1A$ receptor mutant mice exhibit enhanced tonic, stress-induced and fluoxetine-induced serotonergic neurotransmission. *J. Neurochem.* 77: 607-617
- Pazos A, Palacios M (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res.* 346:205-230
- Phillips TJ, Hen R, Crabbe JC (1999). Complications associated with genetic background effects in research using knockout mice. *Psychopharmacology* 147:5-7
- Pickel VM, Joh TH, Reis DJ (1977). A serotonergic innervation of noradrenergic neurons in nucleus locus coeruleus: demonstration by immunocytochemical localization of the transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase. *Brain Res.* 131:197-214
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT $1A$ receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J. Neurosci.* 12:440-453
- Povlock SL, Amara SG (1997). The structure and function of norepinephrine, dopamine, and serotonin transporters, , In: Reith MEA (Eds.): Neurotransmitter transporters – structure, function, and regulation, Humana Press, Totowa-New Jersey, USA, pp.1-28
- Prisco S, Pagannone S, Esposito E (1994). Serotonin-dopamine interaction in the rat ventral tegmental area: an electrophysiological study in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271:83-90

- Radja F, Laporte A, Daval G, Verge D, Gozlan H, Hamon M (1991). Autoradiography of serotonin receptor subtypes in the CNS. *Neurochem. Int.* 18:1-15
- Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R (1998). Serotonin receptor $1A$ knockout: An animal model of anxiety-related disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14476-14481
- Raymond JR, Mukhin YV, Gettys TW, Garnovskaya MN (1999). The recombinant 5-HT $1A$ receptor: G protein coupling and signalling pathways. *Br. J. Pharmacol.* 127:1751-64
- Riad M, Emerit MB, Hamon M (1994). Neurotrophic effects of ipsapirone and other 5-HT $1A$ receptor agonists on septal cholinergic neurons in culture. *Dev. Brain Res.* 82:245-258
- Richer M, Hen R, Blier P (2002). Modification of serotonin neuron properties in mice lacking 5-HT $1A$ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 435:195-203
- Roberts C, Price GW, Middlemiss DN (2001). Ligands for the investigation of 5-HT autoreceptor function. *Brain Res. Bull.* 56:463-469
- Role LW, Kelly JP (1991). The Brain Stem: Cranial Nerve Nuclei and the Monoaminergic Systems. In: Kandel ER, Schwartz J, Jessell (Eds.) *Principles of neural science*. Prentice-Hall International Inc. East Norwalk, USA. pp. 693-699
- Rubenstein JLR (1998). Development of Serotonergic Neurons and Their Projections. *Biol. Psychiatry* 44:145-150
- Saito H, Murai S, ABE E, Masuda Y, Itoh T (1992). Rapid and Simultaneous Assay of Monoamine Neurotransmitters and Their Metabolites in Discrete Brain Areas of Mice by HPLC with Coulometric Detection. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42:351-356
- Saudou F, Hen R (1994). 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. *Neurochem. Int* 25:503-532
- Sharp T, Hjorth S (1990). Application of brain microdialysis to study the pharmacology of the 5-HT $1A$ autoreceptor. *J. Neurosci. Methods* 34:83-90
- Shemer AV, Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM (1991). Dose-related effects of prenatal 5-methoxytryptamine (5-MT) on development of serotonin terminal density and behavior. *Dev. Brain Res.* 59:59-63

- Sibille E, Hen R (2001). Combining genetic and genomic approaches to study mood disorders. *Eur. Neuropsychopharmacology* 11:413-421
- Sikich L, Hickok JM, Todd RD (1990). 5-HT_{1A} receptors control neurite branching during development. *Dev. Brain Res.* 56:269-74
- Sommermeier H, Schreiber R, Greuel JM, De Vry J, Glaser T (1993). Anxiolytic effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist ipsapirone in the rat: neurobiological correlates. *Eur. J. Pharmacol.* 240:29-37
- Sotelo C, Cholley B, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M (1990). Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT_{1A} autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. *Eur. J. Neurosci.* 2:1144-1154
- Sperk G (1982). Simultaneous determination of serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Neurochem.* 38:840-843
- Sperk G, Berger M, Hortnagl H, Hornykiewicz O (1981). Kainic acid-induced changes of serotonin and dopamine metabolism in the striatum and substantia nigra of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 74:279-86
- Sprouse JS, Aghajanian GK (1988). Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology* 27:707-715
- Steindler DA, Trosko BK (1989). Two types of locus coeruleus neurons born on different embryonic days in the mouse. *Anat. Embryol.* 179:423-34
- Suzuki M, Matsuda T, Asano S, Somboonthum P, Takuma K, Baba A (1995). Increase of noradrenaline release in the hypothalamus of freely moving rat by postsynaptic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor activation. *Br. J. Pharmacol.* 115:703-711
- Szabo ST, Blier P (2001). Effects of the selective norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine on norepinephrine and serotonin transmission in the rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 25:845-857
- Szabo ST, de Montigny C, Blier P (1999). Modulation of noradrenergic neuronal firing by selective serotonin reuptake blockers. *Br. J. Pharmacol.* 126:568-571

- Szabo ST, de Montigny C, Blier P (2000). Progressive attenuation of the firing activity of locus coeruleus noradrenergic neurons by sustained administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 3:1-11
- Tanda G, Carboni E, Frau R, Di Chiara G (1994). Increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex: A trait of drugs with antidepressant potential? *Psychopharmacology* 115: 285-288
- Thielen RJ, Fangon NB, Frazer A (1996). 4-(2'-Methoxyphenyl)-1-[2'-[N-(2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]ethyl] piperazine and 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-[N-(2"-pyridinyl)-p-fluorobenzamido]ethyl] piperazine, two new antagonists at pre- and postsynaptic serotonin- $1A$ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:661-670
- Toth M (2003). 5-HT $1A$ Receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety. *Eur. J. Pharmacol.* 463:177-184
- Ueda S, Gu XF, Whitaker-Azmitia PM, Naruse I, Azmitia EC (1994). Neuro-glial neurotrophic interaction in the S-100 β retarded mutant mouse (Polydactyly Nagoya). I. Immunocytochemical and neurochemical studies. *Brain Res.* 633:275-283
- Ueda S, Kokotos Leonardi ET, Bell J 3rd, Azmitia EC (1995). Serotonergic sprouting into transplanted C-6 gliomas is blocked by S-100 beta antisense gene. *Mol. Brain Res* 29: 365-368
- Van Eldik LJ, Zimmer DB (1987). Secretion of S100 β from rat C6 glioma. *Brain Res.* 436: 367-370
- Van Eldik LJ, Christie-Pope B, Bolin LM, Shooter EM, Whetsell WO Jr (1991). Neurotrophic activity of S-100 beta in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Res.* 542:280-285
- Veenstra-Vander Weele J, Anderson GM, Cook Jr, EH (2000). Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. *Eur. J. Pharmacol.* 410:165-181
- Verge D, Daval G, Patey A, Gozlan H, el Mestikawy S, Hamon M (1985). Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT $1A$ subtype. *Eur. J. Pharmacol.* 113:463-464

- Verge D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, el Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M (1986). Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J. Neurosci.* 6:3474-3482
- Voorn P, Kalsbeek A, Jorritsma-Byham B, Groenewegen HJ (1988). The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* 25:857-887
- Whitaker-Azmitia PM (2001). Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. *Brain Res. Bull.* 56:479-485
- Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC (1986). Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors. *Neurosci. Lett.* 67:307-385
- Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC (1994). Astroglial 5-HT_{1A} receptors and S-100 beta in development and plasticity. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 2:233-238
- Whitaker-Azmitia PM, Borella A, Raio N (1995). Serotonin depletion in the adult rat causes loss of the dendritic marker MAP-2: A new animal model of schizophrenia? *Neuropsychopharmacology* 12:269-272
- Whitaker-Azmitia PM, Druseb M, Walkerc P, Lauderd JM (1996). Serotonin as a developmental signal. *Behav. Brain Res.* 73:19-29
- Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC (1990). Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res.* 528:155-158
- Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S, Van Eldik LJ (1989). Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J. Cell Biol.* 109:3063-3071
- Yi SJ, Gifford AN, Johnson KM (1991). Effect of cocaine and 5-HT₃ receptor antagonists on 5-HT-induced [³H]dopamine release from rat striatal synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* 199:185-189
- Yoshioka M, Matsumoto M, Numazawa R, Togashi H, Smith CB, Saito H (1995). Changes in the regulation of 5-hydroxytryptamine release by alpha2-adrenoceptors in the rat hippocampus after long-term desipramine treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 294:565-570

Zhuang XX, Gross C, Santarelli L, Compan V, Trillat A-C, Hen R (1999). Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} Receptors. *Neuropsychopharmacology* 21:52-60

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Natrium Bicinchoninsäure-4,4-di-Carboxy-2,2-Bichinolin
bp	Basenpaar
BS	Hirnstamm (brain stem)
BSA	Rinderserum Albumin (bovine serum albumin)
C	Cingulum
CC	Corpus callosum
CPu	Caudate Putamen
CTT	Tractus tegmentalis centralis
CTX	Cortex cerebri
DA	Dopamin, 3,4-Dihydroxyphenäthylamin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DHBA	3,4-Dihydroxybenzylamin Hydrobromid
5,7-DHT	5,7-Dihydroxytryptamin
DRN	Nucleus raphe dorsalis
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
DPS	Dorsales periventriculares System
DTB	Tractus tegmentalis dorsalis
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaler Tag
EC	Capsula externa
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ED	elektrochemische Detektion

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Fornix
FR	Fasciculus retroflexus
Fro	Frontalcortex
H	Hypothalamus
Hepes	(N-2-Hydroxyethylpiperazin-N' - ethansulfonsäure)
Hip	Hippocampus
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
Hyp	Hypothalamus
HPLC	Hochdruckflüssigkeitchromatographie
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
IgG	Immunglobuline der Klasse G
ip	intraperitoneal
KO	Knockout
L-AADC	L-aromatische Amniosäuredecarboxylase
LC	Locus coeruleus
M	Maus
MAO	Monoaminoxidase
MBP	Myelinbasisprotein
MeT	mesencephales Tegmentum
ML	Lemniscus medialis
MRN	Nucleus raphe medianus
MT	Fasciculus mammillothalamicus
Na-Azid	Natriumazid
NGS	Normales Ziegenserum (normal goat serum)

NHS	Normales Pferdeserum (normal horse serum)
NA	Noradrenalin
NRM	Nucleus raphe magnus
OB	Bulbus olfactorius
(±)-8-OH-DPAT	8-Hydroxy-2-[N-Dipropylamino] Tetralin
P	Postnataler Tag
PC	Commissura posterior
PCA	Perchlorsäure
pCPA	p-Chlorophenylalanin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RF	Formatio reticularis
p-MPPI	4-(2'-Methoxyphenyl)-1-[2'-[N-(2"-pyridinyl)-p-iodo-benzamido] ethyl] piperazin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Spt	Septum
SM	Stria medullaris
SNC	Substantia nigra compacta
ST	Stria terminalis
Syb	Synaptobrevin
Syp	Synaptophysin
Syt	Synaptotagmin
T	Tectum

TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylen-Diamin
TH	Tyrosinhydroxylase
Th	Thalamus
TPH	Tryptrophanhydroxylase
Tween-20	Polyoxyethylenesorbitan
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ÜE	Überexpression
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
WT	Wild-Type
WAY 100635	N-[2-4-(2-Methoxyphenyl)-1-Piperazinylethyl]-N-(2-Pyridinyl) Cyclohexan Carboxamid
ZNS	Zentralnervensystem

9 DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. med. Heide Hörtnagl, meiner Doktormutter danke ich herzlich für die Einladung und Unterstützung meines Aufenthalts in Deutschland, Überlassung des interessanten Dissertationsthemas sowie für die sehr unermüdliche, geduldige wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit. Im Verlauf der gesamten Arbeit gab sie mir zahlreiche fruchtbare Anregungen und versuchte immer wieder wissenschaftliches Denken zu vermitteln.

Bei Herrn Prof. Dr. Veh und insbesondere Frau Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit in den Laboren des Instituts für Anatomie arbeiten zu dürfen und die wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Dr. Thomas Stroh danke ich für die Einarbeitung in verschiedene Labortechniken insbesondere in die Methodik der Immunohistochemie.

Mein Dank gilt besonders Frau Susann Hopf für die stetige liebevolle Diskussionsbereitschaft und Vermittlung der verschiedenen Labortechniken.

Bei Frau Astrid Arnswald möchte ich mich herzlich für die umsichtige, erfahrene und liebevolle Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit bedanken. Herrn Ingo Voigt gebührt Dank für die Lieferung des ausgezeichneten Tiermaterials und die Einführung in die Labortechnik. Meinen Kollegen im Institut für Pharmakologie und Toxikologie wie Frau Christiane Sprang, Frau Dr. Heike Kusserow, Frau Cornelia Tanneberger, Frau Hannelore Glatte, und Institut für Anatomie wie Frau PD G. Grosse, Frau Anna Löchner, Frau Sandra Winter und Herrn Markus Höltje danke ich vor allem für die methodische Unterstützung und das gute Arbeitsklima.

Dem Direktor des Instituts, Herrn Prof. Dr. Thomas Unger danke ich für die Möglichkeit im Institut für Pharmakologie und Toxikologie arbeiten zu dürfen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Forschungsarbeit (HO2201/1-2 und HO2201/2-2).

Bei meiner Familie bedanke ich mich besonders für ihre Verständnisse, Unterstützung, Liebe und Geduld in meinem Aufenthalte in Deutschland.

10 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Dongrui Deng, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen verwendete habe.